



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026196

(51)⁷ A01H 5/00; C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2012-01807

(22) 23/11/2010

(86) PCT/US2010/057886 23/11/2010

(87) WO 2011/063413 26/05/2011

(30) 09014565.7 23/11/2009 EP; 61/263,707 23/11/2009 US; 61/367,251 23/07/2010 US

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/03/2013 300A

(73) 1. Bayer Cropscience N.V. (BE)

J.E. Mommaertslaan 14, B-1831 Diegem, Belgium

2. MS Technologies LLC (US)

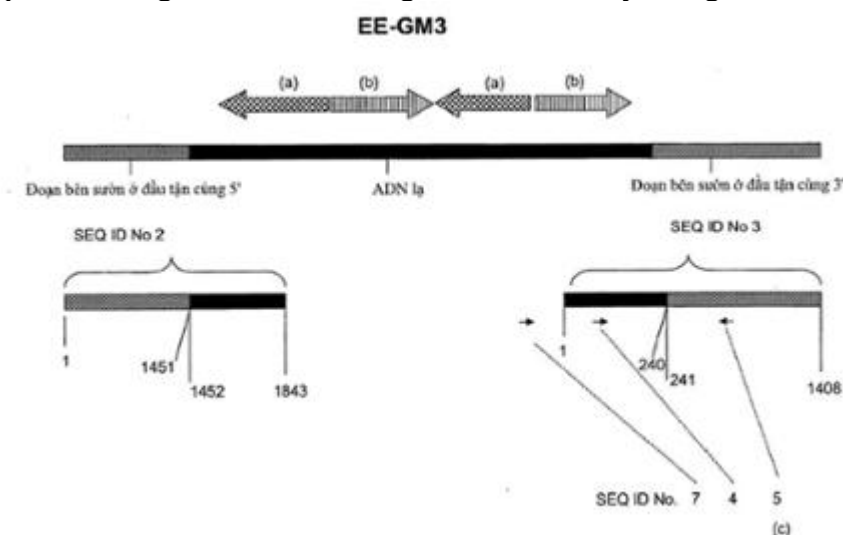
103 Avenue D, West Point, Iowa 52656, United States of America

(72) MASON, Justin, Thomas (US); LETTOW, Leslie, James (US); EBY, Mark, Alan (US); EBY, William, H. (US); WELZ, Guenter (DE); VERHAEGHE, Steven (BE); DE BEUCKELEER, Marc (BE); HABEX, Veerle (BE); FERULLO, Jean-Marc (FR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CÂY ĐỒ TƯƠNG MANG SỰ KIỆN EE-GM3 VÀ EE-GM2 CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ VÀ PHƯƠNG PHÁP NHẬN DẠNG SỰ CÓ MẶT ĐỒNG THỜI CỦA SỰ KIỆN NÀY TRONG MẪU SINH PHẨM

(57) Sáng chế đề cập đến cây đồ tương chuyển gen, nguyên liệu cây và hạt đồ tương chuyển gen đặc hiệu, khác biệt ở chỗ, các sản phẩm này mang cụm gồm các sự kiện biến nạp đặc hiệu ở các vị trí đặc hiệu trong hệ gen của đồ tương. Sáng chế còn đề cập đến các công cụ cho phép nhận dạng nhanh và rõ ràng các sự kiện này trong các mẫu sinh phẩm.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến cây đỗ tương chuyển gen, nguyên liệu cây và hạt đỗ tương chuyển gen, đặc trưng ở chỗ chứa ít nhất hai sự kiện biến nạp đặc hiệu, cụ thể là sự có mặt của ít nhất hai bộ gen mã hóa protein mang lại khả năng chịu được thuốc diệt cỏ, mỗi bộ gen ở một vị trí cụ thể trong hệ gen của đỗ tương. Cây đỗ tương theo sáng chế kết hợp kiểu hình chịu được thuốc diệt cỏ với năng suất trồng trọt, tính ổn định về mặt di truyền và chức năng trên các nền di truyền khác nhau tương đương với giống đỗ tương không biến nạp khi không có (các) thuốc diệt cỏ. Sáng chế này còn đề cập đến phương pháp và bộ kit để nhận dạng sự có mặt của nguyên liệu cây trồng chứa sự kiện biến nạp đặc hiệu EE-GM3 và EE-GM2 hoặc EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự biểu hiện kiểu hình của gen chuyển ở cây trồng được quyết định bởi cả cấu trúc của chính gen đó và vị trí của nó trong hệ gen của cây trồng này. Đồng thời, sự có mặt của các gen chuyển hay "ADN lạ" ở các vị trí khác nhau trong hệ gen sẽ ảnh hưởng đến kiểu hình chung của cây trồng này theo nhiều cách khác nhau. Việc đưa thành công trên quy mô nông nghiệp hoặc trên quy mô công nghiệp một tính trạng mong đợi về mặt thương mại vào cây trồng bằng cách xử lý di truyền có thể là quy trình kéo dài tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau. Sự biến nạp và tái sinh các cây trồng đã biến nạp về mặt di truyền thực ra chỉ là bước đầu tiên trong hàng loạt bước chọn lọc, bao gồm cả việc xác định đặc trưng di truyền bao quát, nhân giống, và đánh giá trong các thực nghiệm trên cánh đồng, cuối cùng dẫn đến việc chọn ra sự kiện ưu tú.

Việc nhận dạng rõ sự kiện ưu tú ngày càng trở nên quan trọng khi xem xét đến các bàn luận về Thực phẩm/Thức ăn Mới, tách riêng các sản phẩm từ nguồn sinh vật biến đổi gen (GMO) và các sản phẩm không từ nguồn sinh vật biến đổi gen và việc nhận dạng nguyên liệu độc quyền. Lý tưởng là, phương pháp nhận dạng như vậy vừa nhanh và vừa đơn giản, không cần đến trang thiết bị thử nghiệm bao quát. Hơn thế nữa, phương pháp này nên đưa ra kết quả cho phép xác định rõ ràng sự kiện ưu tú mà không cần đến sự giải thích của chuyên gia, nhưng vẫn đưa ra để chuyên gia xem xét kỹ lưỡng nếu cần.

Các dụng cụ chuyên biệt để sử dụng trong quy trình nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm được nêu trong bản mô tả này.

Theo sáng chế, EE-GM3 được nhận dạng là sự kiện ưu tú trong quần thể các cây đỗ tương chuyển gen trong quá trình phát triển đỗ tương chịu được thuốc diệt cỏ (*Glycine max*) mang gen mã hóa khả năng chịu được glyphosat kết hợp với gen truyền tính trạng chịu được các chất ức chế 4-hydroxy phenylpyruvat dioxygenaza (HPPD), mỗi gen được kiểm soát bởi một gen khởi đầu có thể biểu hiện được ở cây trồng.

EE-GM1 và EE-GM2 đã từng được nhận dạng là các sự kiện ưu tú trong quần thể các cây đỗ tương chuyển gen trong quá trình phát triển đỗ tương chịu được thuốc diệt cỏ (*Glycine max*) mang gen mã hóa khả năng chịu được glufosinat dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu có thể biểu hiện được ở cây trồng và được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2006/108674 và WO2006/108675 (cả hai công bố này đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các cây đỗ tương mang gen chịu được thuốc diệt cỏ đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tuy nhiên, không có tài liệu kỹ thuật nào bộc lộ hoặc gợi ý về sáng chế.

Trong lĩnh vực kỹ thuật này, đã biết rằng không hề dễ dàng có được sự kiện biến nạp ưu tú chịu được thuốc diệt cỏ trên quy mô thương mại ở cây đỗ tương với năng suất trồng trọt chấp nhận được, không làm giảm sản lượng, và có được đủ khả năng chịu được thuốc diệt cỏ, dĩ nhiên là đối với 3 nhóm thuốc diệt cỏ khác nhau.

Thực tế, đã có thông báo rằng sự kiện đỗ tương đầu tiên (sự kiện 40-3-2) với khả năng chịu được thuốc diệt cỏ đã được đưa ra thị trường, có sự giảm sản lượng đáng kể so với các dòng (gần như) đồng hợp tử (Elmore et al. (2001) *Agron. J.* 93:408-412).

Tương tự, đỗ tương Optimum™ GAT™ (sự kiện 356043) cũng đã được phát triển để kết hợp khả năng chịu được glyphosat với khả năng chịu được các thuốc diệt cỏ ALS, nhưng đã có thông báo rằng chính giống đỗ tương này không đáp ứng tiêu chuẩn về khả năng chịu được glyphosat (mà không kết hợp với một sự kiện đỗ tương chịu được glyphosat khác (như sự kiện 40-3-2) (ví dụ, xem: www.bloomberg.com/apps/news?pid=newsarchive&sid=ad4L0hH9MKWE)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

u hình của gen chuyển đổi tương chuyển gen, hoặc hạt, tế bào hoặc mô của cây này, chứa catxet biểu hiện đã được hợp nhất một cách ổn định vào hệ gen của nó, mà mang gen chịu được thuốc diệt cỏ chứa trình tự mã hóa gen *2mEPSPS* và một gen chịu được thuốc diệt cỏ khác chứa trình tự mã hóa HPPD-PF W336 (cả hai đều được mô tả trong Ví dụ 1.1 trong bản mô tả này và được thể hiện trong SEQ ID No. 1) cũng như catxet biểu hiện thứ hai mang gen chịu được thuốc diệt cỏ chứa trình tự mã hóa phosphinothrixin axetyl transferaza, như được mô tả trong Ví dụ 1 trong bản mô tả này và được thể hiện trong SEQ ID No. 11. Cây đổi tương chuyển gen, hoặc hạt, tế bào hoặc mô của cây này chịu được các thuốc diệt cỏ trên cơ sở glyphosat, trên cơ sở glufosinat, và thuốc diệt cỏ ức chế HPPD như isoxaflutol, và, khi không có (các) thuốc diệt cỏ, có năng suất trồng trọt gần như tương đương với dòng đồng hợp tử không chuyển gen. Sau khi dùng một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ mà cây này chịu được, thì nó sẽ có kiểu hình nông học tốt hơn so với cây không chuyển gen.

Theo sáng chế, cây đổi tương hoặc hạt, tế bào hoặc mô của cây này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất cây đổi tương chuyển gen, hạt, tế bào hoặc mô của cây này, ADN hệ gen của nó khác biệt ở chỗ, trên thực tế khi được phân tích theo Quy trình nhận dạng theo PCR như được nêu trong bản mô tả này, bằng cách sử dụng hai đoạn mỗi lần lượt được hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM3 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM-3, thì thu được đoạn đặc hiệu với EE-GM3 và ngoài ra khi được phân tích theo Quy trình nhận dạng theo PCR như được nêu trong bản mô tả này, bằng cách sử dụng hai đoạn mỗi lần lượt được hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM1 hoặc EE-GM2 và ADN lạ mang các gen chịu được glufosinat, thì thu được đoạn đặc hiệu với EE-GM1 hoặc EE-GM2. Các đoạn mỗi để phát hiện EE-GM3 có thể được lần lượt được hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của SEQ ID No. 2 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ. Các đoạn mỗi để phát hiện EE-GM3 cũng có thể được lần lượt hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của SEQ ID No. 3 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ, như các đoạn mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 4 hoặc SEQ ID No. 7, và tạo ra

đoạn ADN có khoảng từ 100 đến 800 cặp bazơ, như đoạn có khoảng 263 cặp bazơ hoặc khoảng 706 cặp bazơ. Các đoạn mỗi để phát hiện EE-GM1 có thể được lần lượt hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của SEQ ID No. 12 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ. Các đoạn mỗi để phát hiện EE-GM1 cũng có thể được lần lượt hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của SEQ ID No. 13 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ, như các đoạn mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17, và tạo ra đoạn ADN có khoảng từ 100 đến 500 cặp bazơ, như đoạn có khoảng 183 cặp bazơ. Các đoạn mỗi để phát hiện EE-GM2 có thể được lần lượt hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của SEQ ID No. 14 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ. Các đoạn mỗi để phát hiện EE-GM2 cũng có thể được lần lượt hướng đến vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của SEQ ID No. 15 và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ, như các đoạn mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19, và tạo ra đoạn ADN có khoảng từ 100 đến 500 cặp bazơ, như đoạn có khoảng 151 cặp bazơ.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 theo sáng chế đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41659. Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM1 theo sáng chế đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41658. Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM2 theo sáng chế đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660. Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11041. Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11042.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 (hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41659) và còn mang sự kiện ưu tú EE-GM1 (hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41658), hoặc hạt mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 (hạt quy chiếu chứa các sự kiện này được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11041) mà sẽ phát triển thành cây đỗ tương chịu được ít nhất ba thuốc diệt cỏ, đặc biệt là chịu được glyphosat và/hoặc các chất ức chế HPPD như isoxaflutol và/hoặc các chất ức chế glutamin synthetaza như glufosinat.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 (hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41659)

và còn mang sự kiện ưu tú EE-GM2 (hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660), hoặc hạt mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 (hạt quy chiếu chứa các sự kiện này được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11042), mà sẽ phát triển thành cây đổ tương chịu được ít nhất ba thuốc diệt cỏ, đặc biệt là chịu được glyphosat và/hoặc các chất ức chế HPPD như isoxaflutol và/hoặc các chất ức chế glutamin synthetaza như glufosinat.

Hạt có số hiệu lưu giữ ở NCIMB là NCIMB 41659, là mẻ hạt chứa ít nhất là khoảng 95% hạt chuyển gen, mang sự kiện ưu tú EE-GM3, mà sẽ phát triển thành các cây chịu được thuốc diệt cỏ, nhờ đó các cây này là cây chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol. Hạt hoặc hạt giống có thể thu được hoặc thu được từ hạt đã được gửi lưu (ví dụ, sau khi lai chéo với các cây đổ tương khác có nền di truyền khác) có thể được gieo và các cây non có thể được xử lý bằng glyphosat hoặc các chất ức chế HPPD như isoxaflutol như được nêu trong bản mô tả này để thu được các cây chịu được glyphosat hoặc isoxaflutol, mang sự kiện ưu tú EE-GM3. Hạt có số hiệu lưu giữ ở NCIMB là NCIMB 41658 và NCIMB 41660 là các mẻ hạt chứa ít nhất là khoảng 95% hạt chuyển gen, lần lượt mang sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc EE-GM2, mà sẽ phát triển thành các cây chịu được thuốc diệt cỏ, nhờ đó các cây này là cây chịu được glufosinat. Hạt này có thể được gieo và các cây non có thể được xử lý bằng glufosinat như được nêu trong bản mô tả này để thu được các cây chịu được glufosinat, mang sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc EE-GM2.

Hạt có số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-11041, là mẻ hạt chứa ít nhất là khoảng 95% hạt chuyển gen, mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM1 ở dạng đồng hợp tử, mà sẽ phát triển thành các cây chịu được thuốc diệt cỏ, nhờ đó các cây này là các cây chịu được glyphosat, glufosinat và/hoặc isoxaflutol. Hạt hoặc hạt giống có thể thu được hoặc thu được từ hạt đã được gửi lưu (ví dụ, sau khi lai chéo với các cây đổ tương khác có nền di truyền khác) có thể được gieo và các cây non có thể được xử lý bằng glyphosat, glufosinat và/hoặc các chất ức chế HPPD như isoxaflutol, như được nêu trong bản mô tả này để thu được các cây chịu được glyphosat, glufosinat và/hoặc isoxaflutol, mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1.

Hạt có số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-11042, là mẻ hạt chứa ít nhất là khoảng 95% hạt chuyển gen, mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 ở dạng

đồng hợp tử, mà sẽ phát triển thành các cây chịu được thuốc diệt cỏ, nhờ đó các cây này là cây chịu được glyphosat, glufosinat và/hoặc isoxaflutol. Hạt hoặc hạt giống có thể thu được hoặc thu được từ hạt đã được gửi lưu (ví dụ, sau khi lai chéo với các cây đối tượng khác có nền di truyền khác) có thể được gieo và các cây non có thể được xử lý bằng glyphosat, glufosinat và/hoặc các chất ức chế HPPD như isoxaflutol, như được nêu trong bản mô tả này để thu được các cây chịu được glyphosat, glufosinat và/hoặc isoxaflutol, mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2.

Sáng chế còn đề xuất tế bào, mô, cây con, và các thế hệ tiếp theo của cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và còn mang sự kiện ưu tú EE-GM1, mà có thể thu được bằng cách trồng cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 đã được gửi lưu tại ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11041, hoặc bằng cách trồng cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 từ hạt đã được gửi lưu ở NCIMB có số hiệu lưu giữ NCIMB 41659 và lai chéo cây này với cây mang sự kiện ưu tú EE-GM1 phát triển từ hạt đã được gửi lưu ở NCIMB có số hiệu lưu giữ NCIMB 41658. Sáng chế còn đề xuất tế bào, mô, cây con, và các thế hệ tiếp theo của cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và còn mang sự kiện ưu tú EE-GM2, mà có thể thu được bằng cách trồng cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 đã được gửi lưu tại ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11042, hoặc bằng cách trồng cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 từ hạt đã được gửi lưu ở NCIMB có số hiệu lưu giữ NCIMB 41659 và lai chéo cây này với cây mang sự kiện ưu tú EE-GM2 phát triển từ hạt đã được gửi lưu ở NCIMB có số hiệu lưu giữ NCIMB 41660. Sáng chế còn đề xuất cây có thể thu được từ (như bằng cách nhân giống và/hoặc gây giống với) cây đối tượng hoặc hạt như nêu trên. Sáng chế còn đề xuất cây đối tượng mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận dạng cây chuyển gen, hoặc tế bào hoặc mô của cây này, mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2, trong đó phương pháp này dựa trên việc nhận dạng sự có mặt của các trình tự ADN đặc trưng hoặc các axit amin được mã hóa bởi các trình tự ADN như vậy trong cây, tế bào hoặc mô chuyển gen. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các trình tự ADN đặc trưng này là các trình tự gồm ít nhất 15 cặp bazơ, 15 cặp bazơ, ít nhất 20 cặp bazơ, 20 cặp bazơ, hoặc 30 cặp bazơ hoặc hơn 30 cặp bazơ mà chứa vị trí cài xen sự kiện, tức là cả một phần của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ đã được cài xen vào và

cả một phần của hệ gen đối tượng (vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc 3') liền kề với nó, cho phép nhận dạng đặc hiệu sự kiện ưu tú này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận dạng các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm, trong đó các phương pháp này dựa trên cơ sở các đoạn môi hoặc các mẫu dò mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước khuếch đại hai trình tự của axit nucleic có mặt trong các mẫu sinh phẩm, bằng cách áp dụng hai phản ứng chuỗi polymeraza, mỗi phản ứng với ít nhất hai đoạn môi, hoặc một phản ứng chuỗi polymeraza với ít nhất bốn đoạn môi, đoạn môi thứ nhất nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ bao gồm các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, đoạn môi thứ hai nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3, đoạn môi thứ ba nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM1 hoặc EE-GM2, và đoạn môi thứ tư nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM1 hoặc EE-GM2, tốt hơn là để thu hai đoạn ADN có khoảng từ 100 đến 800 cặp bazơ. Các đoạn môi để nhận dạng EE-GM3 có thể lần lượt nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM3 (SEQ ID No. 2, từ vị trí 1 đến vị trí 1451) hoặc nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM3 (phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ vị trí 241 đến vị trí 1408) và trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ (phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ vị trí 1452 đến 1843 hoặc SEQ ID No. 3 từ vị trí 1 đến vị trí 240, hoặc SEQ ID No. 20 từ nucleotit ở vị trí 1452 đến nucleotit ở vị trí 16638 hoặc phần bổ sung của nó). Đoạn môi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và đoạn môi nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 4 hoặc SEQ ID No. 7 nêu trong bản mô tả này. Các đoạn môi để nhận dạng EE-GM1 có thể lần lượt nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM1 (SEQ ID No. 12, từ vị trí 1 đến vị trí 209) hoặc nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM1 (phần bổ sung của SEQ ID No. 13

từ vị trí 569 đến vị trí 1000) và trình tự nằm trong ADN lạ mang gen chịu được thuốc diệt cỏ EE-GM1 (phần bổ sung của SEQ ID No. 12 từ vị trí 210 đến vị trí 720, hoặc SEQ ID No. 13 từ vị trí 1 đến vị trí 568). Đoạn môi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM1 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 16 và đoạn môi nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ của EE-GM1 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 17 nêu trong bản mô tả này. Các đoạn môi để nhận dạng EE-GM2 có thể lần lượt nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM2 (SEQ ID No. 14, từ vị trí 1 đến vị trí 311) hoặc nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM2 (phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ vị trí 508 đến vị trí 1880) và trình tự nằm trong ADN lạ mang gen chịu được thuốc diệt cỏ EE-GM1 (phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ vị trí 312 đến vị trí 810, hoặc SEQ ID No. 15 từ vị trí 1 đến vị trí 507). Đoạn môi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM2 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 18 và đoạn môi nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ của EE-GM2 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 19 nêu trong bản mô tả này. Bước khuếch đại PCR có thể được thực hiện theo cách đồng thời hoặc tuần tự.

Đặc biệt hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại ít nhất hai trình tự của axit nucleic có mặt trong mẫu sinh phẩm, bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza với hai đoạn môi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 4 và SEQ ID No. 5, để thu được đoạn ADN có khoảng 263 cặp bazơ, hoặc với hai đoạn môi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 7, để thu được đoạn ADN có khoảng 706 cặp bazơ, và phản ứng chuỗi polymeraza với hai đoạn môi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17, để thu được đoạn ADN có khoảng 183 cặp bazơ. Hai phản ứng chuỗi polymeraza có thể được thực hiện theo cách đồng thời hoặc tuần tự.

Đặc biệt hơn, sáng chế đề xuất phương pháp nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại ít nhất hai trình tự của axit nucleic có mặt trong mẫu sinh phẩm, bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza với hai đoạn môi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 4 và SEQ ID No. 5, để thu được đoạn ADN có khoảng 263

cặp bazơ, hoặc với hai đoạn mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 7, để thu được đoạn ADN có khoảng 706 cặp bazơ, và phản ứng chuỗi polymeraza với hai đoạn mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19, để thu được đoạn ADN có khoảng 151 cặp bazơ. Hai phản ứng chuỗi polymeraza có thể được thực hiện theo cách đồng thời hoặc tuần tự.

Sáng chế còn đề xuất trình tự bên sườn đặc hiệu của EE-GM3 nêu trong bản mô tả này kết hợp với các trình tự bên sườn đặc hiệu của EE-GM1, mà có thể được sử dụng để phát triển các phương pháp nhận dạng đặc hiệu về sự có mặt đồng thời của EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm. Các trình tự bên sườn đặc hiệu đã kết hợp này còn có thể được sử dụng làm nguyên liệu đối chứng quy chiếu trong các thử nghiệm nhận dạng. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM3 kết hợp với các vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM1 mà có thể được sử dụng để phát triển các đoạn mồi hoặc mẫu dò đặc hiệu như cũng được nêu trong bản mô tả này. Các phân tử axit nucleic, tốt hơn là các phân tử có 150 đến 850 cặp bazơ, chứa trình tự mà có thể được khuếch đại bởi các đoạn mồi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 5 hoặc SEQ ID No. 4 và SEQ ID No. 5 kết hợp với các phân tử axit nucleic chứa trình tự mà có thể được khuếch đại bởi các đoạn mồi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17, đặc biệt,, các phân tử axit nucleic như vậy thu được bằng cách sử dụng các đoạn mồi trong nguyên liệu mang EE-GM3 và EE-GM1 này, cũng là nguyên liệu quy chiếu thích hợp.

Sáng chế còn đề xuất trình tự bên sườn đặc hiệu của EE-GM3 nêu trong bản mô tả này kết hợp với trình tự bên sườn đặc hiệu của EE-GM2, mà có thể được sử dụng để phát triển các phương pháp nhận dạng đặc hiệu về sự có mặt đồng thời của EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm. Các trình tự bên sườn đặc hiệu đã kết hợp này còn có thể được sử dụng làm nguyên liệu đối chứng quy chiếu trong các thử nghiệm nhận dạng. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM3 kết hợp với các vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM2 mà có thể được sử dụng để phát triển các đoạn mồi hoặc mẫu dò đặc hiệu như cũng được nêu trong bản mô tả này. Các phân tử axit nucleic, tốt hơn là các phân tử có 150 đến 850 cặp

bazơ, chứa trình tự mà có thể được khuếch đại bởi các đoạn môi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 5 hoặc SEQ ID No. 4 và SEQ ID No. 5 kết hợp với các phân tử axit nucleic chứa trình tự mà có thể được khuếch đại bởi các đoạn môi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19, đặc biệt là các phân tử axit nucleic thu được bằng cách sử dụng các đoạn môi này trong nguyên liệu mang EE-GM3 và EE-GM2, cũng là nguyên liệu quy chiếu thích hợp.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận dạng sự có mặt đồng thời của EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm trên cơ sở sử dụng các đoạn môi hoặc các mẫu dò đặc hiệu này. Các đoạn môi để phát hiện EE-GM3 có thể chứa, bao gồm hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn trong số trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, kết hợp với các đoạn môi chứa, chứa, hoặc chủ yếu chứa trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn trong số trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1, như trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240. Các đoạn môi để phát hiện EE-GM1 có thể chứa, bao gồm hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 12 từ nucleotit 1 đến nucleotit 209 hoặc phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 569 đến nucleotit 1000, kết hợp với các đoạn môi gồm, chứa, hoặc chủ yếu chứa trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11, như trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 12 từ nucleotit 219 đến nucleotit 720 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 1 đến nucleotit 568. Các đoạn môi còn có thể chứa các trình tự nucleotit này nằm ở đầu tận cùng 3' của chúng, và còn chứa các trình tự không liên quan hoặc các trình tự thu được từ các trình tự nucleotit nêu trên, nhưng chứa các cặp không hợp đôi.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận dạng sự có mặt đồng thời của EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm trên cơ sở sử dụng các đoạn môi hoặc các mẫu dò đặc hiệu này. Các đoạn môi để phát hiện EE-GM3 có thể chứa, bao gồm hoặc chủ yếu

gồm trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp như nêu trong đoạn trên. Các đoạn môi để phát hiện EE-GM2 có thể chứa, bao gồm hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit 311 hoặc phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880, kết hợp với các đoạn môi chứa, bao gồm hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11, như trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507. Các đoạn môi còn có thể chứa các trình tự nucleotit này nằm ở đầu tận cùng 3' của chúng, và còn chứa các trình tự không liên quan hoặc các trình tự thu được từ các trình tự nucleotit nêu trên, nhưng chứa các cặp không hợp đôi.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm, bộ kit này chứa ít nhất một đoạn môi hoặc mẫu dò mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và ít nhất một đoạn môi hoặc mẫu dò mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM1.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm, bộ kit này chứa ít nhất một đoạn môi hoặc mẫu dò mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và ít nhất một đoạn môi hoặc mẫu dò mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ mang gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2.

Ngoài đoạn môi nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' của EE-GM3 và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM1, bộ kit theo sáng chế có thể còn chứa đoạn môi khác nữa mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3 và đoạn môi khác nữa mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM1, để sử dụng trong Quy trình nhận dạng theo PCR.

Ngoài đoạn mỗi nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM3 và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM2, bộ kit theo sáng chế có thể còn chứa đoạn mỗi khác nữa mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3 và đoạn mỗi khác nữa mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM2, để sử dụng trong Quy trình nhận dạng theo PCR.

Đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM3 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và đoạn mỗi nhận dạng các gen chuyển hoặc ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 4 hoặc 7, hoặc đoạn mỗi bất kỳ khác hoặc tổ hợp đoạn mỗi bất kỳ khác để phát hiện EE-GM3 như được nêu trong bản mô tả này, kết hợp với đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM1 mà có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 16 và đoạn mỗi nhận dạng các gen chuyển của ADN lạ mang gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM1 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 17.

Đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM3 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và đoạn mỗi nhận dạng các gen chuyển hoặc ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 4 hoặc 7, hoặc đoạn mỗi bất kỳ khác hoặc tổ hợp đoạn mỗi bất kỳ khác để phát hiện EE-GM3 như được nêu trong bản mô tả này, kết hợp với đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM2 mà có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 18 và đoạn mỗi nhận dạng các gen chuyển của ADN lạ mang gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM2 có thể chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 19.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm, bộ kit này chứa các đoạn mỗi PCR chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 4 và các đoạn mỗi PCR chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17 để sử dụng ở bước nhận dạng EE-GM3/EE-GM1 trên cơ sở PCR.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm, bộ kit này chứa các đoạn mỗi PCR chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 4 và các đoạn mỗi PCR chứa hoặc (chủ

yếu) gồm trình tự nucleotit của SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19 để sử dụng ở bước nhận dạng EE-GM3/EE-GM2 trên cơ sở PCR.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm, trong đó bộ kit này chứa hai mẫu dò đặc hiệu, mẫu dò thứ nhất chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự mà tương ứng với (hoặc bổ sung cho) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với một vùng đặc hiệu của EE-GM3 và mẫu dò thứ hai chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự mà tương ứng với (hoặc bổ sung cho) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với một vùng đặc hiệu của EE-GM1. Tốt hơn nếu trình tự của mẫu dò thứ nhất tương ứng với một vùng đặc hiệu chứa một phần của vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM3 và mẫu dò thứ hai tương ứng với một vùng đặc hiệu chứa một phần của vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM1. Tốt nhất, nếu mẫu dò đặc hiệu EE-GM3 chứa hoặc (chủ yếu) gồm (hoặc bổ sung cho) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 1441 đến 1462 của SEQ ID No. 2 hoặc trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 220 đến 260 của SEQ ID No. 3 và mẫu dò đặc hiệu EE-GM1 chứa, (chủ yếu) gồm (hoặc bổ sung cho) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 199 đến 220 của SEQ ID No. 12 hoặc trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 558 đến 579 của SEQ ID No. 13.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm, trong đó bộ kit này chứa hai mẫu dò đặc hiệu, mẫu dò thứ nhất chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự mà tương ứng với (hoặc bổ sung cho) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với một vùng đặc hiệu của EE-GM3 và mẫu dò thứ hai chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự mà tương ứng với (hoặc bổ sung cho) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với một vùng đặc hiệu của EE-GM2. Tốt hơn nếu trình tự của mẫu dò thứ nhất tương ứng với một vùng đặc hiệu chứa một phần của vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM3 và mẫu dò thứ hai tương ứng với một vùng đặc hiệu chứa một phần của vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM2. Tốt nhất nếu mẫu dò đặc hiệu EE-GM3 chứa hoặc (chủ yếu) gồm (hoặc bổ sung cho) trình tự có

mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 1441 đến 1462 của SEQ ID No. 2 hoặc trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 220 đến 260 của SEQ ID No. 3 và mẫu dò đặc hiệu EE-GM2 chứa hoặc (chủ yếu) gồm (hoặc bổ sung của) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 301 đến 322 của SEQ ID No. 14 hoặc trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nucleotit từ 497 đến 518 của SEQ ID No. 15.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất trình tự ADN chứa điểm nối của sự kiện và polynucleotit đủ dài của cả ADN hệ gen của đồ tương và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ (gen chuyển) của từng sự kiện, sao cho có thể hữu dụng để làm đoạn mẫu hoặc mẫu dò để phát hiện EE-GM3 và EE-GM1. Các trình tự này có thể chứa ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đồ tương và số nucleotit tương tự của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ (gen chuyển) của EE-GM3 hoặc EE-GM1, lần lượt ở mỗi phía của điểm nối. Tốt nhất nếu các trình tự ADN này chứa ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đồ tương và số nucleotit tương tự của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ liên kề với điểm nối trong SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 3 và ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đồ tương và số nucleotit tương tự của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ liên kề với điểm nối trong SEQ ID No. 12 hoặc SEQ ID No. 13.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất trình tự ADN chứa điểm nối của sự kiện và polynucleotit đủ dài của cả ADN hệ gen của đồ tương và ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ (gen chuyển) của từng sự kiện, sao cho hữu dụng để làm đoạn mẫu hoặc mẫu dò để phát hiện EE-GM3 và EE-GM2. Các trình tự này có thể chứa ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đồ tương và số nucleotit tương tự của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ (gen chuyển) của EE-GM3 hoặc EE-GM2, lần lượt ở mỗi phía của vị trí cài xen. Tốt nhất nếu các trình tự ADN này chứa ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đồ tương và số nucleotit tương tự của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ liên kề với điểm nối trong SEQ ID No. 2 hoặc SEQ ID No. 3 và ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đồ tương và số nucleotit tương tự của ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ liên kề với điểm nối trong SEQ ID No. 14 hoặc SEQ ID No. 15.

Các phương pháp và bộ kit trong phạm vi của sáng chế còn có thể được sử dụng cho các mục đích khác nhau như, nhưng không giới hạn ở, các mục đích sau: nhận dạng sự có mặt hoặc xác định ngưỡng (dưới) của EE-GM3 và EE-GM1 hoặc của EE-GM3 và EE-GM2 ở cây trồng, nguyên liệu cây trồng hoặc ở các sản phẩm như, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực phẩm hoặc thức ăn (tươi hoặc đã được chế biến) chứa hoặc thu được từ nguyên liệu cây trồng; thêm vào đó hoặc theo cách khác, các phương pháp và bộ kit theo sáng chế có thể được sử dụng để nhận dạng nguyên liệu cây trồng chuyển gen nhằm mục đích phân biệt giữa nguyên liệu chuyển gen và nguyên liệu không chuyển gen; thêm vào đó hoặc theo cách khác, các phương pháp và bộ kit theo sáng chế có thể được sử dụng để xác định chất lượng (tức là phần trăm nguyên liệu tinh khiết) của nguyên liệu cây trồng mang EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM1.

Sáng chế còn đề xuất vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM3 GM3 kết hợp với các đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu được phát triển từ các trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM1 hoặc EE-GM2, cũng như đề xuất các đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu được phát triển từ các trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM3 kết hợp với các đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu được phát triển từ các trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' và/hoặc 3' của EE-GM1 hoặc EE-GM2.

Sáng chế còn đề xuất ADN hệ gen thu được từ các cây chứa các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc các cây chứa các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2. ADN hệ gen này có thể được sử dụng làm nguyên liệu đối chứng quy chiếu trong các thử nghiệm nhận dạng nêu trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất cây đổ tương chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ, hoặc tế bào, phần, hạt hoặc cây con của cây này, mỗi đối tượng chứa ít nhất hai sự kiện ưu tú, sự kiện ưu tú thứ nhất này chứa ADN lạ chứa:

i) gen khảm thứ nhất mang gen epsps đã được biến đổi từ *Zea mays* mã hóa enzym EPSPS chịu được glyphosat dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu biểu hiện được ở cây trồng, và

ii) gen khảm thứ hai mang gen hppd đã được biến đổi thu được từ *Pseudomonas fluorescens* mã hóa enzym chịu được chất diệt cỏ ức chế HPPD dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu biểu hiện được ở cây trồng, và sự kiện ưu tú thứ hai này mang gen khảm

(thứ ba) mà mang gen chịu được glufosinat đã được biến đổi thu được từ *Streptomyces viridochromogenes* mã hóa enzym glufosinat (hoặc phosphinothrixin) axetyltransferaza dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu biểu hiện được ở cây trồng.

Theo một phương án, sự kiện ưu tú thứ nhất nêu trên chứa các nucleotit từ 1 đến 1451 của SEQ ID No. 2 ngay trước và liền kề với ADN lạ nêu trên và các nucleotit từ 241 đến 1408 của SEQ ID No. 3 ngay sau và liền kề với ADN lạ nêu trên, và sự kiện thứ hai nêu trên chứa các nucleotit từ 1 đến 209 của SEQ ID No. 12 ngay trước và liền kề với ADN lạ nêu trên và các nucleotit từ 569 đến 1000 của SEQ ID No. 13 ngay sau và liền kề với ADN lạ nêu trên, hoặc sự kiện thứ hai nêu trên chứa các nucleotit từ 1 đến 311 của SEQ ID No. 14 ngay trước và liền kề với ADN lạ nêu trên và các nucleotit từ 508 đến 1880 của SEQ ID No. 15 ngay sau và liền kề với ADN lạ nêu trên.

Theo một phương án khác, sự kiện ưu tú này có thể thu được bằng cách nhân giống với cây đỗ tương được trồng từ hạt quy chiếu mang các sự kiện đã được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11041 hoặc PTA-11042, hoặc có thể thu được từ hạt quy chiếu mang sự kiện thứ nhất nêu trên đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41659, và có thể thu được từ hạt quy chiếu mang sự kiện thứ hai nêu trên đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41658 hoặc số hiệu lưu giữ ở NCIMB là NCIMB 41660.

Theo một phương án khác, ADN hệ gen của cây đỗ tương nêu trên, hoặc tế bào, phần, hạt hoặc cây con của nó khi được phân tích bằng cách áp dụng quy trình nhận dạng sự kiện ưu tú đối với sự kiện ưu tú thứ nhất nêu trên bằng hai đoạn mồi chứa trình tự nucleotit lần lượt của SEQ ID No. 4 và SEQ ID No. 5, tạo ra đoạn ADN có khoảng 263 cặp bazơ hoặc 263 cặp bazơ, và khi được phân tích bằng cách áp dụng quy trình nhận dạng sự kiện ưu tú đối với sự kiện ưu tú thứ hai bằng hai đoạn mồi chứa trình tự nucleotit lần lượt của SEQ ID No. 16 và SEQ ID No. 17, thì tạo ra đoạn ADN có khoảng 183 cặp bazơ hoặc 183 cặp bazơ, hoặc bằng hai đoạn mồi chứa trình tự nucleotit lần lượt của SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19, thì tạo ra đoạn ADN có khoảng 151 cặp bazơ hoặc 151 cặp bazơ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận dạng cây đỗ tương chuyển gen, hoặc tế bào, phần, hạt hoặc cây con của nó mang 2 sự kiện ưu tú, trong đó cây, tế bào, hạt, hoặc cây con này chịu được glyphosat, glufosinat và chất diệt cỏ ức chế HPPD (như

isoxaflutol), trong các mẫu sinh phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại đoạn ADN có khoảng từ 100 đến 500 cặp bazơ từ axit nucleic của sự kiện thứ nhất có mặt trong các mẫu sinh phẩm bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza với ít nhất hai đoạn mồi, một trong số các đoạn mồi này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ nhất nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, hoặc vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ nhất này, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO.: 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, đoạn mồi còn lại trong số các đoạn mồi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ của sự kiện thứ nhất nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO.: 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, và bao gồm bước khuếch đại đoạn ADN có từ 50 đến 1000 cặp bazơ, hoặc có từ 100 đến 500 cặp bazơ từ axit nucleic của sự kiện thứ hai nêu trên có mặt trong các mẫu sinh phẩm bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza với ít nhất hai đoạn mồi, một trong số các đoạn mồi này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ hai nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit gồm các nucleotit từ 1 đến 209 của SEQ ID No. 12, hoặc vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ hai nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của các nucleotit từ 569 đến 1000 của SEQ ID No. 13, đoạn mồi còn lại trong số các đoạn mồi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ hai nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO.: 12 từ nucleotit 210 đến nucleotit 720 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 1 đến nucleotit 568.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp nhận dạng cây đổ tương chuyển gen, hoặc tế bào, phần, hạt hoặc cây con của nó mang 2 sự kiện ưu tú, trong đó cây, tế bào, hạt, hoặc cây con này chịu được glyphosat, glufosinat và/hoặc chất diệt cỏ ức chế HPPD (như isoxaflutol), trong các mẫu sinh phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại đoạn ADN có từ 50 đến 1000 hoặc có từ 100 đến 500 cặp bazơ từ axit nucleic của sự kiện thứ nhất có mặt trong các mẫu sinh phẩm bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza với ít nhất hai đoạn mồi, một trong số các đoạn mồi này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ nhất nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận

cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, hoặc vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ nhất này, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ nhất nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, và bao gồm bước khuếch đại đoạn ADN có từ 50 đến 1000 cặp bazơ hoặc có từ 100 đến 500 cặp bazơ từ axit nucleic của sự kiện thứ hai nêu trên có mặt trong các mẫu sinh phẩm bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza với ít nhất hai đoạn mỗi, một trong số các đoạn mỗi này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ hai nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit gồm các nucleotit từ 1 đến 311 của SEQ ID No. 14, hoặc vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ hai, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của các nucleotit từ 508 đến 1880 của SEQ ID No. 15, đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ hai nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng cây đổ tương chuyển gen, hoặc tế bào, phân, hạt hoặc cây con của nó mang 2 sự kiện ưu tú và chịu được glyphosat, glufosinat và chất diệt cỏ ức chế HPPD (như isoxaflutol), trong các mẫu sinh phẩm, bộ kit này chứa một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ nhất nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, hoặc một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ nhất này, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và một đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ nhất nêu trên, ADN lạ nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, và bộ kit này chứa một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ hai nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5'

nêu trên chứa trình tự nucleotit gồm các nucleotit từ 1 đến 209 của SEQ ID No. 12, hoặc một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ hai, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của các nucleotit từ 569 đến 1000 của SEQ ID No. 13, đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ hai nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 12 từ nucleotit 210 đến nucleotit 720 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 1 đến nucleotit 568.

Sáng chế còn đề xuất bộ kit để nhận dạng cây đỗ tương chuyển gen, hoặc tế bào, phân, hạt hoặc cây con của nó mang 2 sự kiện ưu tú và chịu được glyphosat, glufosinat và chất diệt cỏ ức chế HPPD (như isoxaflutol), trong các mẫu sinh phẩm, bộ kit này chứa một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ nhất nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, hoặc một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ nhất này, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và một đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ nhất nêu trên, ADN lạ nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, và bộ kit này chứa một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của sự kiện ưu tú thứ hai nêu trên, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit gồm các nucleotit từ 1 đến 311 của SEQ ID No. 14, hoặc vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú thứ hai, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của các nucleotit từ 508 đến 1880 của SEQ ID No. 15, đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ mang sự kiện thứ hai nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507.

Sáng chế còn đề xuất cây đỗ tương, tế bào cây, mô, hoặc hạt, hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 97%, 98%, hoặc ít nhất là 99% hoặc 99,5% với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638, trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 từ nucleotit

2257 đến nucleotit 16601 hoặc phần bổ sung của chúng, hoặc trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 97%, 98%, hoặc ít nhất là 99% hoặc 99,5% với SEQ ID No. 20 hoặc phần bổ sung của chúng, và hệ gen của chúng chứa phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 97%, 98%, hoặc ít nhất là 99% hoặc 99,5% với trình tự nucleotit EE-GM1 hoặc EE-GM2 hoặc phần bổ sung của chúng, hạt quy chiếu mang EE-GM1 đã được gửi lưu với số hiệu lưu giữ NCIMB 41658, và hạt quy chiếu chứa EE-GM2 đã được gửi lưu với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit EE-GM1 hoặc EE-GM2 ở cây, tế bào cây, mô, hoặc hạt này, là trình tự ADN (như trình tự ADN lạ) trong SEQ ID No. 12 hoặc 13, hoặc trình tự ADN (như trình tự ADN lạ) trong SEQ ID No. 14 hoặc 15, hoặc trình tự ADN trong hệ gen của cây này (như trong hạt đã được gửi lưu mang EE-GM1 hoặc EE-GM2 theo sáng chế) chứa SEQ ID No. 12 và 13 từ nucleotit thứ nhất của trình tự SEQ ID No. 12 đến nucleotit cuối cùng của trình tự SEQ ID No. 13, hoặc trình tự ADN trong hệ gen của cây này chứa SEQ ID No. 14 và 15 từ nucleotit thứ nhất của trình tự SEQ ID No. 14 đến nucleotit cuối cùng của trình tự SEQ ID No. 15.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất cây đỗ tương, tế bào cây, mô, hoặc hạt, có hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic lai với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc lai với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 từ nucleotit vị trí 1452 đến nucleotit vị trí 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc lai với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 hoặc phần bổ sung của nó, và hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic lai với trình tự nucleotit của EE-GM1 hoặc EE-GM2 hoặc phần bổ sung của nó, hạt quy chiếu mang EE-GM1 đã được gửi lưu với số hiệu lưu giữ NCIMB 41658, và hạt quy chiếu chứa EE-GM2 đã được gửi lưu với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660. Theo một phương án của sáng chế, trình tự nucleotit của EE-GM1 hoặc EE-GM2 ở cây, tế bào cây, mô, hoặc hạt này, là ADN lạ trong SEQ ID No. 12 hoặc 13, hoặc ADN lạ trong SEQ ID No. 14 hoặc 15, hoặc trình tự ADN lạ trong hệ gen của cây này (như trong hạt đã được gửi lưu mang EE-GM1 hoặc EE-GM2 theo sáng chế) chứa SEQ ID No. 12 và 13 từ nucleotit thứ nhất của trình tự SEQ ID No. 12 đến nucleotit cuối cùng của trình tự SEQ ID No. 13, hoặc trình tự ADN lạ trong hệ gen của cây này chứa SEQ ID No. 14 và 15 từ nucleotit thứ nhất của trình tự SEQ ID No. 14 đến nucleotit cuối cùng của trình tự SEQ ID No. 15.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế ở các phương án cụ thể nêu trong bản mô tả này, các ví dụ sau có thể được hiểu có dựa vào các hình vẽ kèm theo, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, trong đó:

Fig.1 là sơ đồ thể hiện mối tương quan giữa các trình tự nucleotit được trích dẫn và các đoạn môi đối với sự kiện ưu tú EE-GM3. Đường nằm ngang màu đen: ADN lạ; đường nằm ngang gạch chéo: ADN có nguồn gốc cây trồng; mũi tên nền caro (a): gen mã hóa HPPD PF W366 khảm (xem Bảng 1 về thành phần của gen khảm này); mũi tên nền gạch chéo (b): gen mã hóa 2mEPSPS khảm (xem Bảng 1 về thành phần của gen khảm này); mũi tên màu đen: các đoạn môi oligonucleotit, các hình vẽ nằm dưới các đường nằm ngang thể hiện các vị trí nucleotit; (c) biểu thị phần bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện; Lưu ý: sơ đồ này không được thể hiện đúng tỷ lệ.

Fig.2 là ảnh chụp thể hiện các kết quả thu được theo Quy trình nhận dạng theo PCR phát triển đối với EE-GM3. Tải trình tự lên gel: Làn 1: Chỉ thị phân tử lượng (theo bậc thang 100 cặp bazơ); các làn 2 và 3: các mẫu ADN từ các cây đỗ tương chứa sự kiện chuyển gen EE-GM3; các làn từ 4 đến 7: các mẫu ADN từ các cây đỗ tương chuyển gen không mang sự kiện ưu tú EE-GM3, nhưng chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ giống nhau (sự kiện biến nạp khác); làn 8: mẫu ADN từ đỗ tương loại đại; làn 9: không có đối chứng ADN mẫu; làn 10: chỉ thị phân tử lượng.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện mối tương quan giữa các trình tự nucleotit được trích dẫn và các đoạn môi cho sự kiện ưu tú EE-GM1. Đường nằm ngang màu đen: ADN lạ; đường nằm ngang gạch chéo: ADN có nguồn gốc cây trồng; mũi tên gạch ngang (d): gen mã hóa phosphinothrixin axetyltransferaza khảm (xem SEQ ID No. 11 về thành phần của gen khảm này); mũi tên màu đen: các đoạn môi oligonucleotit, các hình vẽ nằm dưới các đường nằm ngang thể hiện các vị trí nucleotit; (c) biểu thị phần bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện; Lưu ý: sơ đồ này không được thể hiện đúng tỷ lệ.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện mối tương quan giữa các trình tự nucleotit được trích dẫn và các đoạn môi đối với sự kiện ưu tú EE-GM2. Đường nằm ngang màu đen: ADN lạ; đường nằm ngang gạch chéo: ADN có nguồn gốc cây trồng; mũi tên gạch ngang (d): gen mã hóa phosphinothrixin axetyltransferaza khảm (xem SEQ ID No. 11 về

thành phần của gen khảm này; mũi tên màu đen: các đoạn mồi oligonucleotit, các hình vẽ nằm dưới các đường nằm ngang thể hiện các vị trí nucleotit; (c) biểu thị phần bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện; NA: không được áp dụng. Lưu ý: sơ đồ này không được thể hiện đúng tỷ lệ.

Fig.5: Quy trình nhận dạng theo PCR được phát triển đối với EE-GM1. Tải trình tự lên gel: Làn 1: mẫu ADN từ cây đỗ tương mang sự kiện chuyển gen EE-GM1; làn 2: mẫu ADN từ cây đỗ tương chuyển gen không mang sự kiện ưu tú EE-GM1; làn 3: các mẫu ADN đối chứng từ cây đỗ tương loại đại; làn 4: không có đối chứng mẫu; làn 5: chỉ thị phân tử lượng.

Fig.6: Quy trình nhận dạng theo PCR được phát triển đối với EE-GM2. Tải trình tự lên gel: Làn 1: mẫu ADN từ cây đỗ tương mang sự kiện chuyển gen EE-GM2; làn 2: mẫu ADN từ cây đỗ tương chuyển gen không mang sự kiện ưu tú EE-GM2; làn 3: các mẫu ADN đối chứng từ cây đỗ tương loại đại; làn 4: không có đối chứng mẫu; làn 5: chỉ thị phân tử lượng.

Mô tả chi tiết các phương án được ưu tiên thực hiện sáng chế

Sự kết hợp phân tử ADN tái tổ hợp vào hệ gen của cây trồng này thường xảy ra do sự biến nạp của tế bào hoặc mô. Vị trí kết hợp cụ thể thường là do hợp nhất ngẫu nhiên.

ADN được đưa vào hệ gen cây trồng do sự biến nạp của tế bào hoặc mô cây trồng với ADN tái tổ hợp hoặc "ADN gây biến nạp", và bắt nguồn từ ADN gây biến nạp đó, dưới đây được gọi là "ADN lạ" chứa một hoặc nhiều "gen chuyển". Các gen chuyển của EE-GM3 là các gen chịu được glyphosat và thuốc diệt cỏ ức chế HPPD. Thuật ngữ "ADN của cây trồng" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ ADN có nguồn gốc từ cây trồng đã được biến nạp. ADN của cây trồng thường được tìm thấy ở cùng một locus di truyền ở cây trồng loại đại tương ứng. ADN lạ này có thể được đặc trưng bởi địa điểm và kết cấu ở vị trí kết hợp của các phân tử ADN tái tổ hợp trong hệ gen của cây này. Vị trí trong hệ gen của cây này nơi mà ADN tái tổ hợp được cài xen vào còn được gọi là "vị trí cài xen" hoặc "vị trí đích". Việc cài xen ADN tái tổ hợp vào vùng hệ gen cây trồng được gọi là "cài xen sớm ADN của cây trồng" có thể kèm theo sự xóa bỏ ADN cây trồng, được gọi là "xóa bỏ vị trí đích". Các thuật ngữ "vùng bên sườn" hoặc "trình tự bên sườn" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ trình tự gồm ít nhất 20 cặp bazơ, tốt hơn

là ít nhất 50 cặp bazơ, và tối đa 5000 cặp bazơ của ADN khác với ADN đã được đưa vào, tốt hơn là ADN từ hệ gen cây trồng nằm ngay trước và liền kề với, hoặc ngay sau và liền kề với, ADN lạ. Quy trình biến nạp dẫn đến hiện tượng hợp nhất ngẫu nhiên ADN lạ sẽ tạo ra các thể biến nạp có các vùng bên sườn khác nhau, mà đặc trưng và độc nhất đối với mỗi thể biến nạp. Khi ADN tái tổ hợp được đưa vào cây trồng bằng cách lai chéo thông thường, thì vị trí cài xen nó trong hệ gen của cây trồng này, hoặc các vùng bên sườn của nó, thường không thay đổi.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "(trình tự) axit nucleic đã được phân lập" hoặc "(trình tự) ADN đã được phân lập" dùng để chỉ (trình tự) axit nucleic hoặc ADN không còn ở trong môi trường tự nhiên mà nó được phân lập từ đó nữa, ví dụ, trình tự axit nucleic trong vật chủ vi khuẩn khác hoặc trong hệ gen cây trồng, hoặc axit nucleic hoặc ADN đã được dung hợp với ADN hoặc axit nucleic từ nguồn khác, như khi ở trong gen khảm dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu biểu hiện được ở cây trồng.

Sự kiện được định nghĩa là locus di truyền (nhân tạo) nhờ kỹ thuật thiết kế di truyền, mang ADN lạ hoặc gen chuyển chứa ít nhất một bản sao của một gen đang quan tâm hoặc của các gen đang quan tâm. Trạng thái alen thông thường của một sự kiện là sự có mặt hoặc không có mặt của ADN lạ. Sự kiện được đặc trưng về mặt kiểu hình bởi sự biểu hiện của gen chuyển. Ở mức độ di truyền, sự kiện là một phần của thành phần di truyền của cây trồng. Ở mức độ phân tử, sự kiện có thể được đặc trưng bởi bản đồ giới hạn (ví dụ, như được xác định theo phương pháp thẩm tách Nam), bởi các trình tự bên sườn trước và/hoặc sau gen chuyển đó, vị trí của các chỉ thị phân tử và/hoặc kết cấu phân tử của gen chuyển đó. Thông thường, việc biến nạp cây trồng bằng ADN gây biến nạp chứa ít nhất một gen đang quan tâm tạo ra quần thể các thể biến nạp chứa nhiều sự kiện riêng lẻ, mỗi sự kiện này đều độc nhất. Sự kiện được đặc trưng bởi ADN lạ và ít nhất một trong số các trình tự bên sườn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ sự kiện ưu tú là sự kiện được chọn từ nhóm bao gồm các sự kiện, thu được bằng cách biến nạp bằng cùng một ADN gây biến nạp, dựa trên sự biểu hiện và tính ổn định của (các) gen chuyển và tính tương thích của nó với các tính chất nông học tối ưu của cây trồng chứa nó. Do đó, tiêu chí để chọn sự kiện ưu tú là một hoặc nhiều, tốt hơn là hai hoặc nhiều, tốt nhất là tất cả các tiêu chí sau:

a) sự có mặt của ADN lạ không làm tổn hại đến các đặc tính mong đợi khác của cây trồng này, như các đặc tính liên quan đến năng suất trồng trọt hoặc giá trị thương mại;

b) sự kiện được đặc trưng bởi kết cấu phân tử đã được xác định rõ mà được kế thừa một cách ổn định và có thể phát triển các công cụ thích hợp để kiểm soát độ đồng nhất;

c) (các) gen đang quan tâm biểu hiện kiểu hình chính xác, thích hợp và ổn định trong không gian và thời gian, ở cả trạng thái dị hợp tử (hoặc bán hợp tử) và trạng thái đồng hợp tử của sự kiện này, ở mức độ chấp nhận được về mặt thương mại trong một phạm vi các điều kiện môi trường trong đó cây trồng mang sự kiện này dễ được tiếp cận nhằm ứng dụng trong trồng trọt thông thường.

Tốt hơn là, ADN lạ kết hợp với một vị trí trong hệ gen của cây trồng cho phép dễ dàng nhập gen vào nền di truyền thương mại mong đợi.

Tình trạng của sự kiện làm sự kiện ưu tú được xác nhận bằng cách nhập gen của sự kiện ưu tú vào các nền di truyền có liên quan khác nhau và quan sát mức độ phù hợp với một, hai hoặc tất cả các tiêu chí, ví dụ, a), b) và c) nêu trên.

Do đó, thuật ngữ "sự kiện ưu tú" được dùng trong bản mô tả này để chỉ locus di truyền chứa ADN lạ, mà đáp ứng các tiêu chí nêu trên. Cây trồng, nguyên liệu cây trồng hoặc cây con như hạt có thể chứa một hoặc nhiều sự kiện ưu tú trong hệ gen của nó.

Công cụ được phát triển để nhận dạng sự kiện ưu tú hoặc cây trồng hoặc nguyên liệu cây trồng mang sự kiện ưu tú, hoặc các sản phẩm mà chứa nguyên liệu cây trồng mang sự kiện ưu tú này, là dựa trên các đặc tính hệ gen đặc hiệu của sự kiện ưu tú này, như bản đồ giới hạn đặc hiệu của vùng hệ gen chứa ADN lạ, các chỉ thị phân tử hoặc trình tự của (các) vùng bên sườn của ADN lạ.

Một khi một hoặc cả hai vùng bên sườn của ADN lạ được giải trình tự, các đoạn mồi và các mẫu dò có thể được phát triển mà nhận dạng (các) trình tự này trong axit nucleic (ADN hoặc ARN) của mẫu một cách đặc hiệu theo kỹ thuật sinh học phân tử. Ví dụ, phương pháp PCR có thể được phát triển để nhận dạng sự kiện ưu tú này trong các mẫu sinh phẩm (như các mẫu của cây trồng, nguyên liệu cây trồng hoặc các sản phẩm chứa nguyên liệu cây trồng). PCR như vậy là dựa trên ít nhất hai "đoạn mồi" đặc hiệu, một đoạn mồi nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu

tận cùng 3' của sự kiện ưu tú này và đoạn môi còn lại nhận dạng trình tự nằm trong ADN lạ. Tốt hơn nếu các đoạn môi có trình tự có 15 đến 35 nucleotit lần lượt "nhận dạng một cách đặc hiệu" trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú và ADN lạ của sự kiện ưu tú này trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa, sao cho một đoạn cụ thể ("đoạn hợp nhất" hoặc đơn vị siêu sao chép phân biệt) được khuếch đại từ mẫu axit nucleic mang sự kiện ưu tú. Điều đó có nghĩa là chỉ duy nhất đoạn hợp nhất đích, và không trình tự nào khác trong hệ gen cây trồng hoặc ADN lạ này, được khuếch đại trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa.

Các đoạn môi PCR thích hợp để nhận dạng EE-GM3 có thể là các đoạn môi sau:

- các oligonucleotit có chiều dài nằm trong khoảng từ 17 nucleotit đến 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất 17 nucleotit liên tiếp, tốt hơn là 20 nucleotit liên tiếp, được chọn từ ADN cây trồng trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' (SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451) ở đầu tận cùng 3' của chúng (các đoạn môi nhận dạng các trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5'); hoặc
- các oligonucleotit có chiều dài nằm trong khoảng từ 17 nucleotit đến 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất 17 nucleotit liên tiếp, tốt hơn là 20 nucleotit liên tiếp, được chọn từ ADN cây trồng trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' (phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408) ở đầu tận cùng 3' của chúng (các đoạn môi nhận dạng các trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3'); hoặc
- các oligonucleotit có chiều dài nằm trong khoảng từ 17 nucleotit đến 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất 17 nucleotit liên tiếp, tốt hơn là 20 nucleotit liên tiếp, được chọn trong số các trình tự ADN đã được cài xen vào (phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843) ở đầu tận cùng 3' của chúng (các đoạn môi nhận dạng ADN lạ); hoặc
- các oligonucleotit có chiều dài nằm trong khoảng từ 17 nucleotit đến 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất 17 nucleotit liên tiếp, tốt hơn là 20 nucleotit liên tiếp, được chọn trong số các trình tự ADN đã được cài xen vào (SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240); hoặc
- các oligonucleotit thích hợp có chiều dài nằm trong khoảng từ 17 nucleotit đến 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất 17 nucleotit liên tiếp, tốt hơn là 20 nucleotit

liên tiếp, được chọn từ trình tự nucleotit của đoạn ADN đã được cài xen hoặc phân bổ sung của nó (SEQ ID No. 1 hoặc SEQ ID No. 20 từ nucleotit 1452 đến 16638).

Tất nhiên, các đoạn mỗi có thể dài hơn 17 nucleotit liên tiếp nêu trên, và có thể, ví dụ, dài 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nucleotit hoặc thậm chí dài hơn nữa. Các đoạn mỗi có thể hoàn toàn bao gồm trình tự nucleotit được chọn trong số các trình tự nucleotit nêu trên của các trình tự bên sườn và các trình tự ADN lạ. Tuy nhiên, trình tự nucleotit của các đoạn mỗi ở đầu tận cùng 5' của chúng (tức là bên ngoài 17 nucleotit liên tiếp nằm ở đầu tận cùng 3') là kém quan trọng hơn. Do đó, trình tự đầu tận cùng 5' của các đoạn mỗi có thể chứa hoặc bao gồm trình tự nucleotit được chọn trong số các trình tự bên sườn hoặc ADN lạ, nếu thích hợp, nhưng vẫn có thể chứa vài (ví dụ, 1, 2, 5, hoặc 10) cặp không hợp đôi. Trình tự đầu tận cùng 5' của các đoạn mỗi này thậm chí có thể hoàn toàn là trình tự nucleotit không liên quan đến các trình tự bên sườn hoặc ADN lạ, như, ví dụ, trình tự nucleotit thể hiện một hoặc nhiều vị trí nhận dạng enzym giới hạn. Tốt hơn nếu các trình tự không liên quan này hoặc các trình tự ADN bên sườn có cặp không hợp đôi không dài hơn 100 nucleotit, tốt hơn nữa là không dài hơn 50 hoặc thậm chí 25 nucleotit.

Hơn thế nữa, các đoạn mỗi thích hợp có thể chứa, bao gồm hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit trải dài vùng nối giữa các trình tự thu được từ ADN cây trồng và các trình tự ADN lạ ở đầu tận cùng 3' của chúng (nằm ở các nucleotit từ 1451 đến 1452 trong SEQ ID No. 2 và các nucleotit từ 240 đến 241 trong SEQ ID No. 3 đối với EE-GM3) với điều kiện 17 nucleotit liên tiếp nằm ở đầu tận cùng 3' nêu trên không hoàn toàn chỉ có nguồn gốc từ ADN lạ hoặc từ các trình tự thu được từ cây trồng trong SEQ ID No. 2 hoặc 3.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rõ ngay rằng các cặp đoạn mỗi PCR được chọn một cách thích hợp cũng không nên chứa các trình tự bổ sung cho nhau.

Để thực hiện sáng chế, "phần bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID No. X" là trình tự nucleotit có thể thu được từ trình tự nucleotit đã được thể hiện bằng cách thay thế các nucleotit này bằng nucleotit bổ sung của chúng theo quy luật của Chargaff ($A \leftrightarrow T$; $G \leftrightarrow C$) và đọc trình tự theo hướng từ đầu tận cùng 5' đến đầu tận cùng 3', tức là ngược với hướng của trình tự nucleotit được thể hiện.

Các ví dụ về các đoạn môi thích hợp đối với EE-GM3 là các trình tự oligonucleotit của SEQ ID No. 5 (đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3'), SEQ ID No. 4 (đoạn môi nhận dạng ADN lạ để sử dụng với các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3'), hoặc SEQ ID No. 7 (đoạn môi nhận dạng ADN lạ để sử dụng với các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3').

Các ví dụ khác về các đoạn môi oligonucleotit thích hợp đối với EE-GM3 chứa các trình tự sau hoặc (chủ yếu) bao gồm các trình tự này ở đầu tận cùng 3' của chúng:

a. Các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5':

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 264 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 266 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1240 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 265 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 265 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1239 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1241 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1244 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1248 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1250 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 262 đến nucleotit 279
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 263 đến nucleotit 279
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 264 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 266 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1238 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1242 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1243 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1245 đến nucleotit 1263

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1247 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1249 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1249 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 263 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 267 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1242 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1243 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1246 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1246 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1248 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1250 đến nucleotit 1271
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1250 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1241 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1245 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1247 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1247 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1249 đến nucleotit 1271
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1242 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1241 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1243 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1240 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1244 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1239 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1245 đến nucleotit 1261

b. Các đoạn môi nhận dạng trình tự ADN lạ để sử dụng với các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' :

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1751
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1735 đến nucleotit 1754
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1750
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1750
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1752
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1749
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1749
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1751
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1735 đến nucleotit 1751
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1752

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1754
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1747
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1746
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1745
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1747
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1744
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1749
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1745
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1744
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1746
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1747
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1748

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1724 đến nucleotit 1744
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1724 đến nucleotit 1745
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1724 đến nucleotit 1746
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1461 đến nucleotit 1478
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1686
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1486
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1508 đến nucleotit 1527
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1686
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1687
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1689
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1704
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1705
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1709
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1486

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1497
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1498
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1507
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1508
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1690
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1691
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1706
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1707
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1708
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1487
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1499
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1505
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1506

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1507
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1508
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1666 đến nucleotit 1686
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1687
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1689
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1707
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1709
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1710
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1500
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1509
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1689
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1690
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1691

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1705
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1706
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1710
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1488
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1507
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1510
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1512
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1513
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1514
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1692
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1694
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1695
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1696
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1703

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1704
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1711
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1488
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1506
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1511
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1690
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1697
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1709
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1487
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1508
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1511
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1512
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1666 đến nucleotit 1687
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1688

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1692
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1693
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1707
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1490
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1491
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1501
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1509
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1515
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1691
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1694
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1698
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1489
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1689
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1708

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1710
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1711
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1492
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1510
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1666 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1709
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1712
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1488
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1490
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1509
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1511
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1699
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1493
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1494

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1502
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1692
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1491
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1510
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1712
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1713
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1714
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1489
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1700
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1503
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1713
- c. Các đoạn mỗi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3':
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 847
 - phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 849

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 846
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 848
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 848
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 850
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 845
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 847
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 849
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 851
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 844
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 846
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 850
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 852
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 992 đến nucleotit 1009
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 731 đến nucleotit 752

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 795
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 731 đến nucleotit 753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 794
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 796
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 793
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 797
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 792
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 798
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 752
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 754
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 755
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 838 đến nucleotit 854
- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 246 đến nucleotit 263

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 838 đến nucleotit 855

- phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 245 đến nucleotit 264

d. Các đoạn môi nhận dạng trình tự ADN lạ để sử dụng với các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3':

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 173 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 22 đến nucleotit 41

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 172 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 174 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 191 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 171 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 175 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 190 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 192 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 176 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 189 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 193 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 188 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 194 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 199 đến nucleotit 218

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 200 đến nucleotit 218

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 197 đến nucleotit 218

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 201 đến nucleotit 218

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 201 đến nucleotit 220

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 200 đến nucleotit 220

- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 199 đến nucleotit 220
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 200 đến nucleotit 221
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 199 đến nucleotit 221
- trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 150 đến nucleotit 172

Các đoạn môi PCR thích hợp để nhận dạng EE-GM1 đã được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2006/108674, cụ thể là ở trang 8, dòng 4 đến trang 26, dòng 7 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Các đoạn môi PCR thích hợp để nhận dạng EE-GM2 đã được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO2006/108675, cụ thể là ở trang 8, dòng 4 đến trang 33, dòng 4 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "trình tự nucleotit của SEQ ID No. Z từ vị trí X đến vị trí Y" chỉ trình tự nucleotit kể cả hai đầu tận cùng nucleotit.

Tốt hơn nếu đoạn đã được khuếch đại có chiều dài nằm trong khoảng từ 50 đến 500 nucleotit, như chiều dài nằm trong khoảng từ 100 đến 350 nucleotit. Các đoạn môi đặc hiệu có thể có trình tự đồng nhất từ 80% đến 100% với trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' lần lượt của sự kiện ưu tú và ADN lạ của sự kiện ưu tú này, với điều kiện các cặp không hợp đôi vẫn cho phép nhận dạng đặc hiệu sự kiện ưu tú bằng các đoạn môi này trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa. Tuy nhiên, khoảng cặp không hợp đôi cho phép có thể dễ dàng được xác định bằng cách thử nghiệm mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Việc phát hiện đoạn hợp nhất có thể diễn ra theo một vài cách, ví dụ, bằng cách ước lượng kích thước sau phân tích gel. Các đoạn hợp nhất còn có thể được giải trình tự một cách trực tiếp. Các phương pháp khác đặc hiệu theo trình tự để phát hiện các đoạn ADN đã được khuếch đại cũng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vì trình tự của các đoạn môi và vị trí tương ứng của chúng trong hệ gen là độc nhất đối với sự kiện ưu tú, nên bước khuếch đại đoạn hợp nhất sẽ chỉ diễn ra trong các mẫu sinh phẩm chứa (axit nucleic của) sự kiện ưu tú. Tốt hơn nếu, khi thực hiện PCR để nhận dạng sự có mặt của các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong mẫu chưa biết, thì đối chứng được chứa trong bộ đoạn môi mà

có đoạn trong "gen giữ nhà" của giống cây trồng của sự kiện này có thể được khuếch đại. Các gen giữ nhà là các gen được biểu hiện trong hầu hết các loại tế bào và liên quan đến các hoạt tính chuyển hóa cơ bản chung đối với mọi loại tế bào. Tốt hơn nếu đoạn đã được khuếch đại từ gen giữ nhà là đoạn lớn hơn đoạn hợp nhất đã được khuếch đại. Các đối chứng khác cho thể được đưa vào tùy theo mẫu cần được phân tích.

Các quy trình PCR chuẩn đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này, như trong tài liệu "*PCR Applications Manual*" (Roche Molecular Biochemicals, 2nd Edition, 1999) và các tài liệu tham khảo khác. Các điều kiện tối ưu đối với PCR, bao gồm trình tự của các đoạn mồi đặc hiệu, đã được bộc lộ cụ thể trong tài liệu "PCR (or Polymerase Chain Reaction) Identification Protocol" đối với từng sự kiện ưu tú. Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng nhiều thông số trong Quy trình nhận dạng theo PCR có thể cần được điều chỉnh theo các điều kiện thử nghiệm cụ thể, và có thể được biến đổi một chút để thu được các kết quả tương tự. Ví dụ, việc áp dụng phương pháp khác để tạo ra ADN có thể cần sự điều chỉnh ở, ví dụ, lượng các đoạn mồi, polymeraza và các điều kiện ghép đôi được áp dụng. Tương tự, việc lựa chọn các đoạn mồi khác có thể đòi hỏi các điều kiện tối ưu khác đối với Quy trình nhận dạng theo PCR. Tuy nhiên, các điều chỉnh này sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được bộc lộ chi tiết hơn trong các hướng dẫn áp dụng PCR hiện có như hướng dẫn được trích dẫn trên đây.

Theo cách khác, các đoạn mồi đặc hiệu có thể được sử dụng để khuếch đại các đoạn hợp nhất mà có thể được sử dụng làm "các mẫu dò đặc hiệu" để nhận dạng EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm. Cho axit nucleic của mẫu sinh phẩm tiếp xúc với các mẫu dò này, trong các điều kiện cho phép lai các mẫu dò này với các đoạn tương ứng của chúng trong axit nucleic mẫu, dẫn đến sự tạo thành các thể lai axit nucleic/mẫu dò. Sự tạo thành các thể lai này có thể được phát hiện (ví dụ, bằng cách đánh dấu axit nucleic hoặc mẫu dò này), theo cách đó sự tạo thành các thể lai này biểu thị sự có mặt của EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2. Các phương pháp nhận dạng dựa trên quá trình lai với mẫu dò đặc hiệu (trên chất mang pha rắn hoặc trong dung dịch) như vậy đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn nếu mẫu dò đặc hiệu là trình tự mà, trong các điều kiện đã được tối ưu hóa, lai một cách đặc hiệu với vùng nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của sự kiện ưu tú và tốt hơn nếu chứa cả một phần của ADN lạ kế tiếp nó (dưới

đây được gọi là "vùng đặc hiệu"). Tốt hơn nếu mẫu dò đặc hiệu này chứa trình tự có 50 đến 500 cặp bazơ, tốt hơn là có 100 đến 350 cặp bazơ mà có mức đồng nhất (hoặc bổ sung) ít nhất là 80%, tốt hơn là có mức đồng nhất nằm trong khoảng từ 80 đến 85%, tốt hơn là từ 85 đến 90%, tốt hơn nữa là từ 90 đến 95%, tốt nhất là từ 95% đến 100% với trình tự nucleotit của một vùng đặc hiệu. Tốt hơn nếu mẫu dò đặc hiệu chứa trình tự có từ 15 đến 100 nucleotit liên tiếp nhau đồng nhất với (hoặc bổ sung cho) một vùng đặc hiệu của sự kiện ưu tú này.

Ngoài ra, các phương pháp phát hiện đặc hiệu đối với các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc đối với các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 mà khác các phương pháp khuếch đại trên cơ sở PCR cũng có thể được phát triển bằng cách sử dụng thông tin về trình tự đặc hiệu của sự kiện ưu tú nêu trong bản mô tả này. Các phương pháp phát hiện thay thế này bao gồm các phương pháp phát hiện khuếch đại tín hiệu tuyến tính trên cơ sở phân cắt xâm nhập các cấu trúc axit nucleic cụ thể, còn được gọi là công nghệ Invader™ (ví dụ, được mô tả trong patent Mỹ số 5,985,557 "Invasive Cleavage of Nucleic Acids", patent Mỹ số 6,001,567 "Detection of Nucleic Acid sequences by Invader Directed Cleavage", được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Để phát hiện EE-GM3 theo phương pháp này, trình tự đích có thể được lai với oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất đã được đánh dấu chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1469 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò của axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 223 đến nucleotit 240 hoặc phần bổ sung của nó và được lai tiếp với oligonucleotit của axit nucleic thứ hai chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1434 đến nucleotit 1451 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò của axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 258 hoặc phần bổ sung của nó, trong đó oligonucleotit thứ nhất và thứ hai trùng nhau ít nhất một nucleotit. Cấu trúc bộ đôi hoặc bộ ba được tạo ra theo cách lai này cho phép phân cắt mẫu dò chọn lọc bằng enzym (Cleavase®) để trình tự đích còn nguyên vẹn. Tiếp theo, mẫu dò đã được đánh dấu và phân cắt này được phát hiện, có khả năng là thông qua bước trung gian dẫn đến việc tiếp tục khuếch đại tín hiệu. Để phát hiện EE-GM1 theo phương pháp này, trình tự đích có thể được lai với oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất đã được đánh dấu chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 12 từ nucleotit 210 đến

nucleotit 227 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò của axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 561 đến nucleotit 568 hoặc phần bổ sung của nó và được lai tiếp với oligonucleotit của axit nucleic thứ hai chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 12 từ nucleotit 192 đến nucleotit 209 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò của axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 569 đến nucleotit 586 hoặc phần bổ sung của nó, trong đó oligonucleotit thứ nhất và thứ hai trùng ít nhất một nucleotit. Cấu trúc bộ đôi hoặc bộ ba mà được tạo ra theo cách lai này cho phép phân cắt mẫu dò chọn lọc bằng enzym (Cleavase®) để trình tự đích còn nguyên vẹn. Tiếp theo, mẫu dò đã được đánh dấu và phân cắt này được phát hiện, có khả năng là thông qua bước trung gian dẫn đến việc tiếp tục khuếch đại tín hiệu. Để phát hiện EE-GM2 theo phương pháp này, trình tự đích có thể được lai với oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất đã được đánh dấu chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 329 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò của axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 490 đến nucleotit 507 hoặc phần bổ sung của nó và được lai tiếp với oligonucleotit của axit nucleic thứ hai chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 294 đến nucleotit 311 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò của axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 525 hoặc phần bổ sung của nó, trong đó oligonucleotit thứ nhất và thứ hai trùng nhau ít nhất một nucleotit. Cấu trúc bộ đôi hoặc bộ ba mà được tạo ra theo cách lai này cho phép phân cắt mẫu dò chọn lọc bằng enzym (Cleavase®) để trình tự đích còn nguyên vẹn. Tiếp theo, mẫu dò đã được đánh dấu và phân cắt này được phát hiện, có khả năng là thông qua bước trung gian dẫn đến việc tiếp tục khuếch đại tín hiệu.

Thuật ngữ "bộ kit" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ bộ chất phản ứng nhằm mục đích thực hiện phương pháp theo sáng chế, cụ thể hơn là việc nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh phẩm hoặc việc xác định tình trạng hợp tử của nguyên liệu cây trồng mang EE-GM3. Cụ thể hơn, theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến bộ kit chứa ít nhất một hoặc hai đoạn môi đặc hiệu, như nêu trên để nhận dạng sự kiện ưu tú, hoặc ba đoạn môi đặc hiệu để xác định tình trạng hợp tử. Tuy ý, bộ kit này còn có thể chứa chất phản ứng bất kỳ khác nêu trong bản mô tả này trong

Quy trình nhận dạng theo PCR. Theo cách khác, theo một phương án khác của sáng chế, bộ kit này có thể chứa mẫu dò đặc hiệu, như nêu trên, mà lại một cách đặc hiệu với axit nucleic của các mẫu sinh phẩm để nhận dạng sự có mặt của EE-GM3 trong mẫu đó. Tuy ý, bộ kit này còn có thể chứa chất phản ứng bất kỳ khác (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất đệm lai, chất đánh dấu) để nhận dạng EE-GM3 trong các mẫu sinh phẩm, bằng cách sử dụng mẫu dò đặc hiệu.

Bộ kit theo sáng chế có thể được sử dụng, và các thành phần của nó có thể được điều chỉnh một cách cụ thể, nhằm mục đích kiểm soát chất lượng (ví dụ, độ tinh khiết của mẻ hạt), phát hiện sự có mặt hoặc không có mặt của sự kiện ưu tú trong nguyên liệu cây trồng hoặc nguyên liệu chứa hoặc thu được từ nguyên liệu cây trồng, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực phẩm hoặc thức ăn.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "mức đồng nhất trình tự" đối với các trình tự nucleotit (ADN hoặc ARN) dùng để chỉ số vị trí nucleotit đồng nhất chia cho số nucleotit của trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự. Việc so sánh trình tự giữa hai trình tự nucleotit được thực hiện theo thuật toán của Wilbur và Lipmann (Wilbur and Lipmann, 1983, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80:726) bằng cách sử dụng cỡ cửa sổ là 20 nucleotit, chiều dài ký tự là 4 nucleotit, và điểm trừ khoảng cách là 4. Phân tích có sự trợ giúp của máy tính và dịch nghĩa dữ liệu trình tự, kể cả việc so sánh trình tự như nêu trên, có thể được thực hiện một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách áp dụng gói phần mềm phân tích trình tự của Genetics Computer Group (GCG, University of Wisconsin Biotechnology Center). Các trình tự được thể hiện là "về cơ bản tương tự" khi các trình tự này có mức đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 75%, đặc biệt là ít nhất khoảng 80%, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 85%, khá đặc biệt là ít nhất khoảng 90%, đặc biệt là ít nhất khoảng 95%, đặc biệt hơn nữa là ít nhất khoảng 98%, hoặc ít nhất khoảng 99%. Rõ ràng rằng khi các trình tự ARN được cho là về cơ bản tương tự hoặc có mức đồng nhất trình tự nhất định với các trình tự ADN, thì thymidin (T) trong trình tự ADN được xem là tương đương với uraxil (U) trong trình tự ARN. Cũng rõ ràng rằng, có thể xuất hiện các khác biệt hoặc đột biến nhỏ trong các trình tự ADN theo thời gian và có thể cho phép có một số cặp không hợp đôi đối với các đoạn môi hoặc các mẫu dò đặc hiệu với sự kiện theo sáng chế, nên trình tự ADN bất kỳ được nêu ở đây theo phương án bất kỳ của sáng chế đối với ADN bên sườn ở đầu tận cùng 3' hoặc 5' bất kỳ hoặc đối với đoạn cài xen

hoặc ADN lạ bất kỳ hoặc đoạn môi hoặc mẫu dò bất kỳ theo sáng chế, đều bao gồm các trình tự về cơ bản tương tự với các trình tự nêu trong bản mô tả này, như các trình tự lai với, hoặc có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự đã nêu đối với ADN bên cạnh ở đầu tận cùng 3' hoặc 5' bất kỳ, đoạn môi hoặc mẫu dò bất kỳ hoặc đối với đoạn cài xen hoặc ADN lạ bất kỳ theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đoạn môi" dùng để chỉ axit nucleic bất kỳ có khả năng môi quy trình tổng hợp axit nucleic mới theo quy trình phụ thuộc mẫu, như PCR. Thông thường, các đoạn môi là các oligonucleotit có 10 đến 30 nucleotit, nhưng các trình tự dài hơn cũng có thể được sử dụng. Các đoạn môi có thể ở dạng sợi đôi, mặc dù dạng sợi đơn được ưu tiên hơn. Các mẫu dò có thể được sử dụng làm đoạn môi, nhưng chúng được thiết kế để liên kết với ADN hoặc ARN đích và không cần được sử dụng trong quy trình khuếch đại.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nhận dạng" khi đề cập đến các đoạn môi đặc hiệu, dùng để chỉ sự lai đặc hiệu giữa các đoạn môi đặc hiệu với trình tự axit nucleic ở sự kiện ưu tú trong các điều kiện thiết lập trong phương pháp (như các điều kiện của Quy trình nhận dạng theo PCR) trên thực tế, bằng cách đó xác định được tính đặc hiệu theo sự có mặt của các đối chứng dương và âm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "lai" khi liên quan đến các mẫu dò đặc hiệu, dùng để chỉ sự liên kết giữa mẫu dò này với một vùng đặc hiệu trong trình tự axit nucleic của sự kiện ưu tú trong các điều kiện chuẩn nghiêm ngặt. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "các điều kiện chuẩn nghiêm ngặt" dùng để chỉ các điều kiện đối với bước lai nêu trong bản mô tả này hoặc các điều kiện lai thông thường như đã được mô tả bởi Sambrook et al., 1989 (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), mà ví dụ có thể bao gồm các bước sau: 1) cố định các đoạn ADN hệ gen cây trồng trên màng lọc, 2) lai sơ bộ màng lọc này trong thời gian từ 1 đến 2 giờ ở nhiệt độ 42°C trong formamit 50%, 5 X SSPE, 2 X chất phản ứng Denhardt và SDS 0,1%, hoặc trong thời gian từ 1 đến 2 giờ ở nhiệt độ 68°C trong 6 X SSC, 2 X chất phản ứng Denhardt và SDS 0,1%, 3) bổ sung mẫu dò lai đã được đánh dấu vào, 4) ủ trong thời gian từ 16 đến 24 giờ, 5) rửa màng lọc trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng trong 1X SSC, SDS 0,1%, 6) rửa màng lọc ba lần trong 20 phút, mỗi lần ở nhiệt độ 68°C trong 0,2 X SSC, SDS 0,1%, và 7) cho màng lọc

này tiếp xúc với màng tia X trong thời gian từ 24 đến 48 giờ ở nhiệt độ -70°C cùng với màn tăng độ sáng.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “mẫu sinh phẩm” là mẫu cây trồng, nguyên liệu cây trồng hoặc các sản phẩm chứa nguyên liệu cây trồng. Thuật ngữ "cây trồng" được dự định bao gồm mô của cây đỗ tương (*Glycine max*), ở giai đoạn phát triển bất kỳ, cũng như tế bào, mô hoặc cơ quan bất kỳ lấy từ hoặc có nguồn gốc từ cây đỗ tương bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt, lá, phôi, hoa, rễ, tế bào đơn, giao tử, dịch nuôi cấy tế bào, dịch nuôi cấy mô hoặc thể nguyên sinh bất kỳ. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "nguyên liệu cây trồng" dùng để chỉ nguyên liệu thu được hoặc có nguồn gốc từ cây trồng. Các sản phẩm chứa nguyên liệu cây trồng liên quan đến thực phẩm, thức ăn hoặc các sản phẩm khác được sản xuất bằng cách sử dụng nguyên liệu cây trồng hoặc có thể bị nhiễm nguyên liệu cây trồng. Cần phải hiểu rằng, trong phạm vi của sáng chế, các mẫu sinh phẩm này được thử nghiệm về sự có mặt của các axit nucleic đặc hiệu với EE-GM3, EE-GM1 và EE-GM2 ám chỉ sự có mặt của các axit nucleic trong mẫu đó. Do đó, các phương pháp được đề cập đến trong bản mô tả này nhằm nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 hoặc EE-GM3 và EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm, liên quan đến việc nhận dạng các axit nucleic trong các mẫu sinh phẩm mang sự kiện ưu tú này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ "chứa" được giải thích là nêu cụ thể sự có mặt của các đặc điểm, số nguyên, bước, chất phản ứng hoặc thành phần như được đề cập đến, nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc bổ sung thêm một hoặc nhiều đặc điểm, số nguyên, bước hoặc thành phần, hoặc các nhóm của chúng. Do đó, ví dụ, axit nucleic hoặc protein chứa trình tự nucleotit hoặc axit amin, có thể chứa nhiều nucleotit hoặc nhiều axit amin hơn so với các axit nucleic hoặc protein được trích dẫn trên thực tế, tức là được gộp vào axit nucleic hoặc protein lớn hơn. Gen khả chứa trình tự ADN đã được xác định về mặt chức năng hoặc cấu trúc, có thể còn chứa các trình tự ADN khác nữa, như gen khởi đầu hoặc các trình tự kết thúc phiên mã.

Sáng chế còn đề cập đến việc phát triển cụm gồm sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc cụm gồm sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 ở cây đỗ tương, cây chứa cụm gồm các sự kiện, cây con thu được từ các cây này và tế bào cây, hoặc nguyên liệu cây trồng thu được từ các cây chứa các cụm này. Các cây mang sự

kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2 có thể thu được như được mô tả trong Ví dụ 1. Các cụm thu được bằng cách lai chéo các cây chứa các sự kiện đơn lẻ bằng cách áp dụng các phương pháp nhân giống thông thường và nhận dạng cây con của nó chứa hai sự kiện khác nhau.

Các cây đổ tương hoặc nguyên liệu cây mang EE-GM3 và EE-GM1 có thể được nhận dạng theo Quy trình nhận dạng theo PCR đã được mô tả đối với EE-GM3 và EE-GM1 trong Ví dụ 2. Một cách vắn tắt, ADN hệ gen đổ tương có mặt trong mẫu sinh phẩm được khuếch đại theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' của EE-GM3 như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 5, và đoạn mồi mà nhận dạng trình tự trong ADN lạ, như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 4 và còn bằng cách sử dụng đoạn mồi mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' của EE-GM1 như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 16, và đoạn mồi mà nhận dạng trình tự trong ADN lạ, như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 17.

Các cây đổ tương hoặc nguyên liệu cây mang EE-GM3 và EE-GM2 có thể được nhận dạng theo Quy trình nhận dạng theo PCR đã được mô tả đối với EE-GM3 và EE-GM2 trong Ví dụ 2. Một cách vắn tắt, ADN hệ gen đổ tương có mặt trong mẫu sinh phẩm được khuếch đại theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' của EE-GM3 như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 5, và đoạn mồi mà nhận dạng trình tự trong ADN lạ, như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 4 và còn bằng cách sử dụng đoạn mồi mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' của EE-GM2 như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 18, và đoạn mồi mà nhận dạng trình tự trong ADN lạ, như đoạn mồi có trình tự SEQ ID No. 19.

Các đoạn mồi ADN khuếch đại một phần của trình tự đổ tương nội sinh được sử dụng làm đối chứng dương cho bước khuếch đại PCR. Nếu khi khuếch đại theo phương pháp PCR, các nguyên liệu tạo ra các đoạn có kích thước mong đợi, thì nguyên liệu này chứa nguyên liệu cây trồng từ cây đổ tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 hoặc từ cây đổ tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2.

Các cây mang EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2 được đặc trưng bởi khả năng chịu được glyphosat của chúng, cũng như khả năng chịu các chất ức chế

HPPD như isoxaflutol của chúng và cả khả năng chịu glufosinat của chúng. Các cây chứa các cụm sự kiện này còn được đặc trưng bởi các đặc tính nông học tương đương với các giống đỗ tương có bán trên thị trường, khi không dùng thuốc diệt cỏ. Đã quan sát thấy rằng sự có mặt của ADN lạ trong các vùng cài xen của hệ gen cây đỗ tương nêu trong bản mô tả này mang lại các đặc tính kiểu hình và các tính chất phân tử đặc biệt thú vị cho cây chứa sự kiện này.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến tổ hợp hoặc các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 và/hoặc EE-GM2 ở các cây đỗ tương, thu được bằng cách cài xen gen chuyển ở các vị trí đặc hiệu trong hệ gen của đỗ tương, các sự kiện ưu tú này mang lại khả năng chịu được glyphosat, glufosinat và thuốc diệt cỏ ức chế HPPD như isoxaflutol cho các cây đỗ tương đó, và trong đó các sự kiện ưu tú này không gây ra tác động bất kỳ đến năng suất trồng trọt của cây đỗ tương này làm ảnh hưởng một cách tiêu cực đến sản lượng của các cây đỗ tương đó, so với các dòng đồng hợp tử (như được sử dụng trong bản mô tả, các thuật ngữ "dòng đồng hợp tử" hoặc "dòng gần như đồng hợp tử" là các dòng đỗ tương có cùng nền di truyền nhưng thiếu các gen chuyển, như các cây có cùng nền di truyền với cây được dùng để biến nạp, hoặc dòng tương đồng phân ly mất các gen chuyển). Đặc biệt, sáng chế đề cập đến tổ hợp gồm các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 và/hoặc EE-GM2 ở cây đỗ tương, trong đó sự cài xen hoặc sự có mặt của sự kiện ưu tú này trong hệ gen của cây đỗ tương này không làm tăng tính miễn cảm đối với bệnh, không làm giảm sản lượng, hoặc không làm tăng hiện tượng đổ gãy, ở cây đỗ tương này, so với các dòng đồng hợp tử. Do đó, sáng chế đề cập đến tổ hợp gồm các sự kiện ưu tú ở cây đỗ tương, được ký hiệu là EE-GM3 và EE-GM1 và/hoặc EE-GM2, mà làm cho cây đỗ tương có thể chịu được việc áp dụng glyphosat, glufosinat và thuốc diệt cỏ ức chế HPPD (đồng thời hoặc riêng rẽ) mà không gây ảnh hưởng một cách tiêu cực đến sản lượng của cây đỗ tương này so với các dòng đồng hợp tử, trong khi đó cây đỗ tương này không có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê về tính miễn cảm với bệnh, hoặc hiện tượng đổ gãy của chúng, so với các cây đỗ tương đồng hợp tử. Các đặc tính này làm cho tổ hợp gồm các sự kiện ưu tú theo sáng chế rất đáng quan tâm trong việc phòng trừ cỏ dại kháng glyphosat trên cánh đồng đỗ tương, và cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp ngăn ngừa hoặc làm trễ sự phát triển thêm tính kháng glyphosat trên cánh đồng đỗ tương (ví dụ, bằng cách sử dụng glyphosat và isoxaflutol và/hoặc glufosinat,

hoặc bằng cách sử dụng isoxaflutol và glyphosat và/hoặc glufosinat, hoặc bằng cách sử dụng glufosinat và glyphosat và/hoặc isoxaflutol, đảm bảo ít nhất 2 hoặc thậm chí 3 kiểu tác động khác nhau của các thuốc diệt cỏ được dùng trên cánh đồng đỗ tương).

Sáng chế còn đề cập đến cây đỗ tương hoặc một phần của nó mang sự kiện EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc EE-GM2, trong đó hạt đỗ tương tiêu biểu mang sự kiện EE-GM3 đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ 41659, hạt đỗ tương tiêu biểu mang sự kiện ưu tú EE-GM1 đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41658, hạt tiêu biểu mang sự kiện ưu tú EE-GM2 đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660, hạt đỗ tương tiêu biểu mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 đã được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11041, và hạt đỗ tương tiêu biểu mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 đã được gửi lưu ở ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-11042.

Các cây đỗ tương hoặc phần của nó mang EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2 có thể thu được bằng cách kết hợp các sự kiện ưu tú tương ứng như có thể tìm được trong số các hạt tương ứng đã được gửi lưu theo cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm bằng cách lai chéo các cây từ hạt đã được gửi lưu, gom cây con của chúng, và nhận dạng các cây con chứa tổ hợp thích hợp gồm các sự kiện ưu tú. Sáng chế còn đề cập đến hạt của các cây này, chứa các sự kiện này, cũng như sản phẩm đỗ tương được tạo ra từ các hạt này, trong đó sản phẩm đỗ tương nêu trên mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM2. Sản phẩm đỗ tương này có thể là hoặc có thể bao gồm bột xay thô, hạt nghiền, bột, vảy, v.v.. Đặc biệt, sản phẩm đỗ tương này chứa axit nucleic tạo ra các đơn vị siêu sao chép để xác định sự kiện EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc EE-GM2, các đơn vị siêu sao chép này chứa SEQ ID No. 2 hoặc 3, SEQ ID No. 14 hoặc 15 và/hoặc SEQ ID No. 12 hoặc 13. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm đỗ tương, phương pháp này bao gồm bước thu được hạt đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc EE-GM2, và từ đó sản xuất ra sản phẩm đỗ tương.

Sáng chế còn đề cập đến cây đỗ tương, là cây con của cây đỗ tương bất kỳ trong số các cây đỗ tương nêu trên, và mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM2.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất cây đỗ tương chịu được các thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc glufosinat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao

gồm bước đưa sự kiện EE-GM3 và sự kiện EE-GM1 hoặc EE-GM2 vào hệ gen của cây này, cụ thể là bằng cách lai chéo cây đổ tương thứ nhất mang sự kiện EE-GM3 với cây đổ tương mang EE-GM1 và/hoặc EE-GM2, và bước chọn lọc cây con chịu được glyphosat và/hoặc glufosinat và/hoặc isoxaflutol.

Sáng chế còn đề cập đến cây chịu được glyphosat và glufosinat và/hoặc isoxaflutol, cụ thể là không làm giảm sản lượng, và có các đặc tính nông học chấp nhận được, chứa protein 2mEPSPS, HPPD và PAT, và có khả năng tạo ra đơn vị siêu sao chép để xác định được các sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng đổ tương mang các sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2, hoặc cánh đồng sẽ trồng cây đổ tương này, bao gồm bước xử lý cánh đồng này bằng lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ trên cơ sở isoxaflutol, glyphosat và/hoặc glufosinat, trong đó các cây đó chịu được (các) thuốc diệt cỏ này.

Sáng chế còn đề cập đến cây đổ tương, tế bào, mô hoặc hạt đổ tương, mang EE-GM3 và EE-GM1, đặc trưng ở chỗ hệ gen của các tế bào của nó chứa trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 và trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên, và cả trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 12 từ nucleotit 199 đến 220 và trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 13 từ nucleotit 558 đến 579, hoặc phần bổ sung của các trình tự này.

Sáng chế còn đề cập đến cây đổ tương, tế bào, mô hoặc hạt đổ tương, mang EE-GM3 và EE-GM2, đặc trưng ở chỗ hệ gen của các tế bào của nó chứa trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 và trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự này, và cả trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 14 từ nucleotit 301 đến 322 và trình tự axit nucleic có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID No. 15 từ nucleotit 497 đến 518, hoặc phần bổ sung của các trình tự này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "isoxaflutol" dùng để chỉ thuốc diệt cỏ isoxaflutol [tức là (5-xyclopropyl-4-isoxazolyl)[2-(metylsulfonyl)-4-(triflometyl)phenyl]metanon], chất chuyển hóa có hoạt tính của nó, diketonitril, và hỗn hợp hoặc dung dịch bất kỳ chứa các hợp chất này. Các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD có thể được dùng cho các cây mang các sự kiện theo sáng chế là các diketonitril, ví dụ, 2-xyano-3-xyclopropyl-1-(2-metylsulphonyl-4-triflometylphenyl)-propan-1,3-dion và 2-xyano-1-[4-(metylsulphonyl)-2-triflometylphenyl]-3-(1-metylxyclopropyl)propan-1,3-fion; các isoxazol khác; và các pyrazolinat, ví dụ, topamezon [tức là [3-(4,5-dihydro-3--isoxazolyl)-2-metyl-4-(metylsulfonyl)phenyl](5-hydroxy-1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)metanon], và pyrasulfotol [(5-hydroxy-1,3-dimetyl pyrazol-4-yl)(2-metyl-4-trifluarometylphenyl)metanon]; hoặc pyrazofen [2-[4-(2,4-diclobenzoyl)-1,3-dimetylpyrazol-5--yloxy]axetophenon].

Theo một phương án của sáng chế, cánh đồng sẽ trồng cây đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 có thể được xử lý bằng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD, như isoxaflutol ('IFT'), trước khi trồng cây đỗ tương hoặc gieo hạt đỗ tương, để làm sạch cỏ dại trên cánh đồng nhờ chất ức chế HPPD, để không cạnh tác, rồi sau đó trồng cây hoặc gieo hạt đỗ tương trên cánh đồng đã được xử lý sơ bộ đó (bón vào đất bằng cách sử dụng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD). Hoạt tính còn lại của IFT cũng sẽ bảo vệ các cây đỗ tương nảy mầm và phát triển khỏi sự cạnh tranh của cỏ dại trong các giai đoạn phát triển đầu tiên. Khi cây đỗ tương đạt được kích thước nhất định, và cỏ dại có xu hướng tái xuất hiện, thì có thể phun lên ngọn các cây này glyphosat, hoặc hỗn hợp chất ức chế HPPD - glyphosat làm thuốc diệt cỏ sau nảy mầm.

Theo một phương án khác của sáng chế, cánh đồng đã được gieo hạt mang biến có EE-GM3 có thể được xử lý bằng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD, như IFT, sau khi gieo hạt nhưng trước khi cây đỗ tương nảy mầm (cánh đồng này có thể được làm sạch cỏ dại trước khi gieo hạt bằng cách khác, thường là các biện pháp cạnh tác thông thường như cày, cày xới, hoặc chuẩn bị luống ươm hạt), trong đó hoạt tính còn lại sẽ giữ cho cánh đồng này sạch cỏ nhờ thuốc diệt cỏ sao cho các cây đỗ tương nảy mầm và phát triển không bị cạnh tranh bởi cỏ dại (dùng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD trước khi nảy mầm). Khi cây đỗ tương đạt được kích thước nhất định, và cỏ dại có xu hướng tái xuất hiện,

glyphosat hoặc hỗn hợp chất ức chế HPPD - glyphosat có thể được phun lên ngọn các cây này làm thuốc diệt cỏ sau nảy mầm.

Theo một phương án khác của sáng chế, các cây mang sự kiện EE-GM3, có thể được xử lý bằng cách phun thuốc diệt cỏ ức chế HPPD, như IFT, lên ngọn cây đỗ tương (nảy mầm từ hạt đã gieo), để làm sạch cỏ dại trên cánh đồng nhờ chất ức chế HPPD, mà có thể được dùng cùng với (ví dụ, trong một thùng khuấy phun), sau đó hoặc trước đó là xử lý bằng cách phun glyphosat lên ngọn các cây này làm thuốc diệt cỏ sau nảy mầm (dùng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD sau nảy mầm (cùng hoặc không cùng glyphosat)).

Cũng theo sáng chế, các cây đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM2 có thể được xử lý bằng các thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ hoặc thuốc trừ nấm sau hoặc các hạt đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM2 có thể được bao bằng lớp bao hạt chứa các thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ hoặc thuốc trừ nấm sau:

Các thuốc diệt cỏ dùng cho đỗ tương:

Alaclo, Bentazon, Trifluralin, Clorimuron-Etyl, Cloransulam-Metyl, Fenoxaprop, Fomesafen, Fluazifop, Glyphosat, Imazamox, Imazaquin, Imazethapy, (S-)Metolaclo, Metribuzin, Pendimethalin, Tepraloxymid, Isoxaflutol, Glufosinat.

Các thuốc trừ sâu dùng cho đỗ tương:

Lamda-xyhalothrin, Metomyl, Parathion, Thiocarb, Imidacloprid, Clothianidin, Thiametoxam, Thiacloprid, Axetamiprid, Dinetofuran, Flubendiamit, Rynaxyp, Xyazyp, Spinosad, Spinotoram, Emamectin-Benzoat, Fipronil, Ethiprol, Deltamethrin, β -Xyfluthrin, gama và lambda Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)metyl](2,2-đifloetyl)amino]furan-2(5H)-on, Spirotetramat, Spinodiclofen, Triflumuron, Flonicamid, Thiodicarb, beta-Xyfluthrin.

Các thuốc diệt nấm dùng cho đỗ tương:

Azoxystrobin, Xyproconazol, Epoxiconazol, Flutriafol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Trifloxystrobin, Prothioconazol, Tetraconazol.

Các ví dụ sau mô tả cách nhận dạng các sự kiện ưu tú EE-GM3, EE-GM1 và EE-GM2 và các cây mang cụm sự kiện EE-GM3 với EE-GM1 hoặc EE-GM3 với EE-GM2

và việc phát triển các công cụ nhận dạng một cách cụ thể sự kiện ưu tú EE-GM3, EE-GM1 hoặc EE-GM2 và các cụm chứa chúng trong các mẫu sinh phẩm.

Trong các Ví dụ, trừ khi có quy định khác, tất cả các kỹ thuật tái tổ hợp được thực hiện theo các quy trình chuẩn như đã được mô tả trong tài liệu: "Sambrook J and Russell DW (eds.) (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York" và "Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (eds.) (2006) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York".

Các nguyên liệu chuẩn và quy chiếu đã được mô tả trong tài liệu: "Croy RDD (ed.) (1993) *Plant Molecular Biology LabFax*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford and Blackwell Scientific Publications, Oxford" và "Brown TA, (1998) *Molecular Biology LabFax*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego". Các nguyên liệu và phương pháp chuẩn cho phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) có thể được tìm thấy trong tài liệu: "McPherson MJ and Moller SG (2000) PCR (The Basics), BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford" và "*PCR Applications Manual*, 3rd Edition (2006), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim hoặc www.roche-applied-science.com".

Nên hiểu rằng nhiều thông số trong quy trình thử nghiệm bất kỳ như các quy trình PCR trong các Ví dụ nêu dưới đây có thể cần được điều chỉnh theo các điều kiện thử nghiệm cụ thể, và có thể được thay đổi một chút để thu được các kết quả tương tự. Ví dụ, việc áp dụng phương pháp khác để chuẩn bị ADN hoặc việc lựa chọn các đoạn môi khác trong phương pháp PCR có thể đòi hỏi các điều kiện tối ưu khác đối với quy trình PCR. Tuy nhiên, các điều chỉnh này sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được bộc lộ một cách chi tiết hơn trong các hướng dẫn áp dụng PCR hiện có.

Trong phần mô tả và các ví dụ có viện dẫn đến các trình tự sau:

SEQ ID No. 1: trình tự nucleotit của đoạn Sall của vector pSF10.

SEQ ID No. 2: trình tự nucleotit chứa vùng đầu tận cùng 5' nằm bên sườn ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3.

SEQ ID No. 3: trình tự nucleotit chứa vùng đầu tận cùng 3' nằm bên sườn ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3.

SEQ ID No. 4: đoạn mồi SOY028

SEQ ID No. 5: đoạn mồi SOY029

SEQ ID No. 6: đoạn mồi SMP187

SEQ ID No. 7: đoạn mồi STV019

SEQ ID No. 8: trình tự nucleotit của đơn vị siêu sao chép

SEQ ID No. 9: đoạn mồi 1 để khuếch đại đoạn đối chứng (SOY01)

SEQ ID No. 10: đoạn mồi 2 để khuếch đại đoạn đối chứng (SOY02)

SEQ ID No. 11: trình tự nucleotit của pB2/P35SAcK

SEQ ID No. 12: trình tự nucleotit chứa vùng đầu tận cùng 5' nằm bên sườn ADN
lạ trong EE-GM1

SEQ ID No. 13: trình tự nucleotit chứa vùng đầu tận cùng 3' nằm bên sườn ADN
lạ trong EE-GM1

SEQ ID No. 14: trình tự nucleotit chứa vùng đầu tận cùng 5' nằm bên sườn ADN
lạ trong EE-GM2

SEQ ID No. 15: trình tự nucleotit chứa vùng đầu tận cùng 3' nằm bên sườn ADN
lạ trong EE-GM2

SEQ ID No. 16: đoạn mồi SOY06

SEQ ID No. 17: đoạn mồi SOY07

SEQ ID No. 18: đoạn mồi SOY09

SEQ ID No. 19: đoạn mồi SOY010

SEQ ID No. 20: trình tự nucleotit của ADN lạ và các trình tự bên sườn trong EE-
GM3 của cây

SEQ ID No. 21: đoạn mồi SHA130

SEQ ID NO.: 22: đoạn mồi SHA178

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Biến nạp Glycine max bằng các gen chịu được thuốc diệt cỏ

1.1. Mô tả ADN lạ chứa gen khả 2mEPSPS và HPPD-Pf-W336

Plasmid pSF10 là vector tách dòng thu được từ pUC19, chứa gen *2mepsps* khả và gen *hppd-Pf-W336* khả nằm trên đoạn Sall khoảng 7,3kb. Phần mô tả chi tiết về ADN nằm giữa hai vị trí giới hạn Sall được thể hiện trong Bảng 1 sau. Trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID No. 1.

Bảng 1. Các vị trí nucleotit của ADN nằm giữa các vị trí giới hạn Sall của pSF10 (SEQ ID No. 1)

Vị trí nucleotit	Định hướng	Mô tả và tài liệu tham khảo
188-479	bổ sung	3' nos: trình tự bao gồm vùng không dịch mã ở đầu tận cùng 3' của gen nopalin synthaza từ T-ADN của pTiT37 của <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker et al. 1982, <i>Journal of Molecular and Applied Genetics</i> , 1, 561-573)
480-1556	bổ sung	hppdPf W336: trình tự mã hóa của 4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza của chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> A32 đã được biến đổi bằng cách thay thế axit amin Glyxin 336 bằng Tryptophan, như đã được mô tả bởi Boudec et al. (2001) patent Mỹ số US6245968B1
1557-1928	bổ sung	TPotp Y: trình tự mã hóa của dẫn xuất peptit chuyển tiếp đã được tối ưu hóa (vị trí 55 thay đổi thành Tyrosin), chứa trình tự của các gen cấu trúc siêu phân tử nhỏ RuBisCO của <i>Zea mays</i> (ngô) và <i>Helianthus annuus</i> (hướng dương), như đã được mô tả bởi Lebrun et al. (1996) US5510471
1929-2069	bổ sung	5'tev: trình tự bao gồm trình tự dẫn đầu của virut khả thuốc lá như đã được mô tả bởi Carrington và Freed (1990) <i>Journal of Virology</i> , 64, 1590-

		1597
2070-3359	bổ sung	Ph4a748 ABBC: trình tự bao gồm vùng gen khởi đầu của gen histon H4 của <i>Arabidopsis thaliana</i> , chứa bản lặp nội tại (Chaboute et al., 1987) <i>Plant Molecular Biology</i> , 8, 179-191.
3360-4374		Ph4a748: trình tự bao gồm vùng gen khởi đầu gen histon H4 của <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaboute et al., 1987) <i>Plant Molecular Biology</i> , 8, 179-191.
4375-4855		intron1 h3At: intron thứ nhất của gen II của biến thể histon H3.III của <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet et al., 1992) <i>Journal of Molecular Biology</i> , 225, 569-574.
4856-5227		TPotp C: trình tự mã hóa của peptit chuyển tiếp đã được tối ưu hóa, chứa trình tự của các gen cấu trúc siêu phân tử nhỏ RuBisCO của <i>Zea mays</i> (ngô) và <i>Helianthus annuus</i> (hướng dương), như đã được mô tả bởi Lebrun et al. (1996) US5510471
5228-6565		2mepsps: trình tự mã hóa của gen 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphat synthaza đột biến kép của <i>Zea mays</i> (ngô) (Lebrun et al., 1997) WO9704103-A1
6566-7252		3'histonAt: trình tự bao gồm vùng không dịch mã ở đầu tận cùng 3' của gen histon H4 của <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaboute et al., 1987) 6566-7252 <i>Plant Molecular Biology</i> , 8, 179-191.

1.2. Sự kiện EE-GM3

Đoạn pSF10 đã được duỗi thẳng ở SalI đã tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) khoảng 7,3kb (chứa gen chịu được glyphosat *2mEPSPS* và gen chịu được chất ức chế HPPD *HPPD-Pf- W336*) được sử dụng để thu được các cây đổ tương

đã được biến nạp bằng cách chuyển thẳng gen vào các tế bào đỗ tương kiểu Jack (Nickell, C. D., G. R. Noel, D. J. Thomas, and R. Waller. *Registration of 'Jack' soybean. Crop Sci* 1365. 30, 1990), sau đó tái sinh các tế bào cây đã được biến nạp vào các cây đỗ tương hữu thụ chuyển gen.

1.2.1 Nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3

Sự kiện ưu tú EE-GM3 được chọn lọc dựa trên quy trình chọn lọc bao quát dựa trên khả năng biểu hiện tốt và tính ổn định của các gen chịu được thuốc diệt cỏ, và đánh giá tính tương thích của nó với các đặc tính nông học tối ưu như chiều cao của cây, chiều cao đến đốt, khả năng đứng vững, sức sống, năng suất hạt. Các cây đỗ tương mang sự kiện này được chọn lọc trong số nhiều sự kiện biến nạp khác nhau thu được bằng cách sử dụng các gen khả năng giống nhau. Các thông số được sử dụng ở bước chọn lọc sự kiện này bao gồm: a) khả năng chịu được thuốc diệt cỏ isoxaflutol chấp nhận được khi áp dụng trong các thử nghiệm trên cánh đồng, b) khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat chấp nhận được khi áp dụng trong các thử nghiệm trên cánh đồng, c) khả năng chịu được thuốc diệt cỏ kết hợp isoxaflutol và glyphosat chấp nhận được khi áp dụng trong các thử nghiệm trên cánh đồng, d) cài xen gen chuyển chịu được thuốc diệt cỏ vào một locus đơn lẻ trong hệ gen cây đỗ tương, không có khung vector, e) đặc tính nông học chung tương tự với cây gốc được dùng để biến nạp (độ trưởng thành, tình trạng đổ gãy, tính miễn cảm đối với bệnh, v.v.), và f) không làm giảm đáng kể sản lượng do cài xen ADN gây biến nạp (so với dòng đồng hợp tử không mang sự kiện này, như dòng cây trồng được dùng để biến nạp, phát triển trong cùng điều kiện giống như vậy).

Ở thế hệ T3, dòng đồng hợp tử của sự kiện biến nạp đỗ tương EE-GM3 được chọn lọc để sản xuất hạt. Các nghiên cứu trên cánh đồng nông nghiệp lặp lại ở nhiều nơi được thực hiện ở các vùng làm thích nghi giống gốc, Jack. Các đánh giá trên cánh đồng bao gồm khả năng chịu được thuốc diệt cỏ và năng suất trồng trọt. Đã thấy rằng năng suất trồng trọt của cây mang EE-GM3 ngang bằng Jack (khi không dùng thuốc diệt cỏ).

Các đánh giá trên cánh đồng còn chỉ ra rằng các cây mang sự kiện EE-GM3:

- có hình thái học thực vật và các đặc tính hạt tương tự với Jack,
- không có thay đổi về đáp ứng đối với các bệnh ở đỗ tương so với Jack, và
- không có thay đổi về sự nảy mầm và tình trạng ngủ của hạt so với Jack.

Hạt (thể hệ T1 hoặc S1) thu được từ cây của thể biến nạp ban đầu (T0) (cây đã được biến nạp với cấu trúc để tạo ra sự kiện EE-GM3) trong nhà kính được trồng trên cánh đồng. Ba lô thí nghiệm được trồng và được phun 0, 2, hoặc 4kg/hecta glyphosat. Hạt thu được từ các cây thể hiện khả năng chịu thuốc diệt cỏ, glyphosat, ở mức độ mong đợi.

Hạt (thể hệ T2) thu được từ các cây T1 tự thụ phấn trồng trên cánh đồng được gieo "trồng theo hàng". Phân tích khi bình phương dữ liệu phân tách đối với các hàng (chịu được hoàn toàn hoặc chịu được một phần) và của các cây riêng rẽ trong hàng (chịu được hoặc nhạy cảm) thể hiện hiện tượng di truyền theo thuyết Menden như mong đợi của một cái xen đối với EE-GM3.

Tiếp tục lựa chọn và tăng hạt cho đến khi xác định được một dòng đồng hợp tử đối với sự kiện biến nạp EE-GM3 và nó được chọn để sản xuất hạt cốt lõi trong thể hệ thứ tư. Sau đó, hạt thể hệ T5 được dùng làm ứng viên để phát triển các giống khác nhau. Các cây thuộc thể hệ thứ sáu (thể hệ T6) được lai chéo với dòng nhân giống đồng tương thông thường theo chương trình nhập gen được thiết kế để chuyển sự kiện này vào nền tảng quỹ gen đồng tương thương mại rộng hơn. Các cây lai F1 (dòng EE-GM3 x dòng thông thường) được cho phát triển đến trưởng thành và hạt F2 được trồng. Các mẫu lá của 901 cây F2 được phân tích bằng các đoạn môi PCR đã được thiết kế để xác định mức độ hợp tử của biến thể cái xen EE-GM3. Đã quan sát được tỷ lệ mong đợi 1:2:1 đối với sự phân tách một biến thể cái xen theo các quy luật của Menden.

Sự kiện EE-GM3 đã chọn lọc được đưa vào các nền di truyền thương mại khác nhau, và các kết quả của các thử nghiệm trên cánh đồng ở các nơi khác nhau được so sánh. Các cây được thử thách bằng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ isoxaflutol bằng cách áp dụng nhiều xử lý khác nhau. Các cây này thể hiện khả năng chịu tốt đối với thuốc diệt cỏ. Hàng trăm cây đồng tương khác nhau mang sự kiện EE-GM3 được sử dụng trong nghiên cứu di truyền, và các thuốc diệt cỏ được sử dụng. Sau đó, các dòng đã chọn lọc từ thử nghiệm này được nhân lên trên cánh đồng và cũng được xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Từ thử nghiệm đó, 50 dòng đã chọn lọc được nhân lên, và chúng cũng được xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Điểm số độ độc hại đối với cây trồng cho các dòng cuối đã được phun isoxaflutol và glyphosat thể hiện một số khuynh hướng thay đổi về đáp ứng, nhưng khoảng đáp ứng giữa các dòng này thể hiện khuynh hướng thay đổi

tương tự như quan sát được đối với 4 bản sao của sự kiện EE-GM3 trong nền Jack gốc, phát triển trong cùng các điều kiện xử lý và môi trường. Do đó, đã quan sát được khả năng chịu các thuốc diệt cỏ tương ứng trên một phạm vi chất mầm lớn ở các cây mang EE-GM3.

Hơn thế nữa, các cây mang sự kiện EE-GM3 có hình thái học lá, hoa và quả bình thường, khả năng sinh sản mỹ mãn, và không thể hiện bệnh hoặc tính nhạy cảm bất thường đối với côn trùng trên nhiều nền di truyền. Trong quá trình nhập gen vào nhiều nền di truyền, không quan sát thấy bất kỳ vấn đề bất thường hoặc dị thường nào.

Trong một mùa, nghiên cứu tại 10 địa điểm được tiến hành để so sánh năng suất trồng trọt của đỗ tương chịu được hai thuốc diệt cỏ mang sự kiện biến nạp EE-GM3 với giống gốc biến nạp, Jack và một số giống đỗ tương không chuyển gen. Bằng cách áp dụng thiết kế lô thí nghiệm hoàn chỉnh ngẫu nhiên, các cây EE-GM3 được trồng vào các luống lặp lại với đối chứng cỏ dại thông thường hoặc các thuốc diệt cỏ dự kiến, glyphosat và isoxaflutol. Các luống cây đỗ tương mang sự kiện biến nạp EE-GM3 được phun thuốc diệt cỏ isoxaflutol với nồng độ đích 70 gam hoạt chất/hecta và thuốc diệt cỏ glyphosat với nồng độ đích 1060 gam hoạt chất/hecta. Việc dùng thuốc diệt cỏ được thực hiện đối với các cây này bằng cách phun vào lá ở giai đoạn phát triển V4-V5 của cây. Thực hiện các quan sát về mặt nông học vào đầu mùa, giữa mùa và cuối mùa. Mật độ cây (thông số; số lượng cây đứng vững) ở luống của giống Jack và luống của giống không chuyển gen là cao hơn luống mang sự kiện EE-GM3 một độ lệch chuẩn. Chênh lệch về số lượng cây đứng vững đầu mùa có thể là do chất lượng lô hạt, vì hạt cho cây mang EE-GM3 được sản xuất trong vườn ươm trái mùa, trong khi hạt của giống không chuyển gen được sản xuất trong mùa sản xuất bình thường lân cận với Mỹ. Tuy nhiên, số ngày để đạt được mức độ nảy mầm 50% và xếp hạng sức sống cây là như nhau, chứng tỏ rằng các mẻ hạt này là tương đương về các thông số sản xuất này. Trong số lượng cây đứng vững cuối mùa, Jack và giống không chuyển gen vẫn khác các cây EE-GM3 một độ lệch chuẩn. Sản lượng theo luống của các cây mang sự kiện EE-GM3 cũng thấp hơn sản lượng theo luống của Jack một độ lệch chuẩn, có lẽ là do mật độ cây ở các luống mang sự kiện EE-GM3 thấp hơn. Sản lượng của giống không chuyển gen là cao hơn Jack như có thể được mong đợi do ưu thế về sản lượng tiềm năng thấy ở các giống gần đây.

Trong một thử nghiệm, tiến hành xếp hạng sức khỏe cây ở ba giai đoạn phát triển: V4-5, R1 và trưởng thành hoàn toàn. Đánh giá đầu tiên được tiến hành ngay sau khi dùng thuốc diệt cỏ dự kiến. Vào thời điểm đánh giá sức khỏe cây lần cuối cùng, các cây mang EE-GM3 đã được phun cả hai thuốc diệt cỏ có cùng kết quả như các cây Jack không được phun, hoặc các cây mang EE-GM3 không được phun. Khi xếp hạng bởi các chuyên gia nông nghiệp, các cây đã được phun thuốc diệt cỏ được xếp hạng sức khỏe từ 3 đến 4 (thương tổn nhẹ) ở các giai đoạn phát triển V4-5 và R1 của cây. Các cây không được phun (các cây Jack không biến nạp hoặc các cây đối tượng mang EE-GM3) được xếp hạng từ 4,6 đến 4,8 (hạng 5 biểu thị không hề thương tổn). Khi xếp hạng sức khỏe cây lần cuối cùng, tất cả các luống đều xếp hạng 5 (không hề thương tổn).

Một mùa thử nghiệm là mùa có mức độ mưa khác thường và thương tổn cây trồng ở cây EE-GM3 do thuốc diệt cỏ dự kiến là rõ ràng hơn so với mức độ quan sát được ở các mùa khác. Các đánh giá trên cánh đồng còn bao gồm việc theo dõi các đặc tính sung sức (sinh sản, kháng bệnh, sức sinh sản, mức độ phát tán hạt, tình trạng ngủ của hạt, mức độ ổn định của hạt). Các cây mang EE-GM3 và các cây Jack không khác nhau về các đặc tính sinh sản; số ngày để nảy mầm, số ngày ra hoa đến 50% và số ngày quả chín đến 90%. Đã không thấy khác biệt trong phản ứng với các hiện tượng lây nhiễm tự nhiên các bệnh ở cây và các loài côn trùng gây hại. Mặc dù EE-GM3 tạo ra sản lượng cuối cùng thấp hơn Jack, không tìm thấy khác biệt nào về sức sinh sản (trọng lượng 100 hạt). Việc đánh giá các thông số về mức độ phát tán hạt (vỡ quả đỗ và đỗ gãy cây) chỉ ra rằng EE-GM3 và Jack có cùng điểm số vỡ quả đỗ, nhưng các cây EE-GM3 được thấy là ít có xu hướng bị đỗ gãy hơn. Đánh giá hạt thu được từ 10 nơi không cho thấy phát sinh mối quan ngại nào nhờ thử nghiệm sự nảy mầm hoặc thử nghiệm tình trạng ngủ của hạt.

Trong các thử nghiệm này ở mùa có lượng mưa bất thường, sản lượng cuối cùng của các cây EE-GM3, bất kể việc xử lý phòng trừ cỏ dại thế nào, là thấp hơn sản lượng của Jack một độ lệch chuẩn (có lẽ là do mật độ cây ở các luống mang sự kiện EE-GM3 thấp hơn). Trong mùa ẩm ướt khác thường, thương tổn cây trồng (mất trắng ở từ 10 đến 30% diện tích trồng) được thông báo đối với các luống EE-GM3 đến sáu tuần sau khi phun vào lá các thuốc diệt cỏ glyphosat và isoxaflutol. Tuy nhiên, cho đến khi trưởng thành, tất cả các luống đều được xếp hạng sức khỏe cây là “không thương tổn”. Mong đợi rằng các thử nghiệm lặp lại trên cánh đồng tại nhiều địa điểm với EE-GM3 đã được

nhập gen vào nền cây đỗ tương ưu tú, khi so với các dòng cùng kiểu gần như đồng hợp tử không mang gen chuyển, không cho thấy sự chênh lệch nào về sản lượng giữa các cây mang sự kiện EE-GM3 và dòng gần như đồng hợp tử (khi không được xử lý bằng thuốc diệt cỏ).

Hơn nữa, trong thử nghiệm lặp lại trên cánh đồng, thấy có độ chịu được đáng kể của cây trồng (mất trắng dưới 10%) ở các cây đỗ tương mang EE-GM3 khi được xử lý trước khi nảy mầm hoặc sau khi nảy mầm bằng IFT (70g hoạt chất/hecta cùng với 0,5% NIS, do Agridex cung cấp), mà độ chịu được đáng kể của cây trồng (mất trắng dưới 10%) còn được thấy ở các cây đỗ tương mang EE-GM3 khi được xử lý sau khi nảy mầm bằng pyrasulfotol (35g hoạt chất/hecta với 0,5% NIS, do Agridex cung cấp), là một thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác.

1.2.2 Nhận dạng các vùng bên sườn và ADN lạ của sự kiện ưu tú EE-GM3

Trình tự của các vùng nằm bên sườn ADN lạ mang các gen chịu được thuốc diệt cỏ ở sự kiện ưu tú EE-GM3 được xác định là như sau:

1.2.2.1. Vùng bên sườn phải (đầu tận cùng 5')

Đoạn được nhận dạng là chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' được giải trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 2. Trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 tương ứng với ADN của cây trồng, trong khi trình tự từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 tương ứng với ADN lạ.

1.2.2.2. Vùng bên sườn trái (đầu tận cùng 3')

Đoạn được nhận dạng là chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' được giải trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 3. Trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 tương ứng với ADN lạ, trong khi trình tự từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408 tương ứng với ADN của cây trồng.

1.2.2.3. ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3

Bằng cách áp dụng các kỹ thuật phân tử khác nhau, đã xác định được rằng ADN lạ của sự kiện ưu tú EE-GM3 chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ chứa hai trình tự histonAt không đầy đủ ở đầu tận cùng 3' theo định hướng đầu nối đầu, sau đó là 2 bản sao gần như đầy đủ của đoạn SalI của pSF10 nằm theo hướng đầu nối đuôi (xem Fig.1).

Do đó, ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3 lần lượt chứa các trình tự sau:

- từ nucleotit 1 đến nucleotit 199: trình tự nucleotit tương ứng với phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 6760 đến nucleotit 6958;
- từ nucleotit 200 đến nucleotit 624: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 6874 đến nucleotit 7298;
- từ nucleotit 625 đến nucleotit 7909: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 7 đến nucleotit 7291;
- từ nucleotit 7910 đến nucleotit 15163: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 12 đến nucleotit 7265; và
- từ nucleotit 15164 đến nucleotit 15187: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 217 đến nucleotit 240 (trình tự này không tương ứng với ADN plasmit pSF10 hay ADN cây trồng loại đại và do đó được chỉ định là ADN điền đầy).

ADN lạ này được nằm ngay trước và liền kề với ADN lạ này là trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến 1451 và được nằm ngay sau và liền kề với ADN lạ này là trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408.

Việc giải trình tự ADN đầy đủ đã được xác nhận đối với các trình tự ADN lạ và các trình tự ADN bên sườn ở EE-GM3 tạo ra trình tự đã được thông báo ở SEQ ID No. 20. Trong trình tự này, ADN đã cài xen là từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638, và 2 bản sao gần như đầy đủ của pSF10 nằm theo hướng đầu nối đuôi là từ nucleotit 2257 đến nucleotit 16601. Trình tự ADN bên sườn ở đầu tận cùng 5' trong SEQ ID No. 20 là trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 trong SEQ ID No. 20, và trình tự ADN bên sườn ở đầu tận cùng 3' trong SEQ ID No. 20 là trình tự từ nucleotit 16639 đến nucleotit 17806 trong SEQ ID No. 20.

1.3. Mô tả ADN lạ chứa gen khảm phosphinothrixinaxetyltransferaza

Plasmid pB2 P35SAcK là vector tách dòng thu được từ pUC19 chứa gen *pat* khảm. Vector này được mô tả trong Bảng 2 sau. Trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 11.

Bảng 2. Các vị trí nucleotit của các thành phần của pB2/P35SAcK (SEQ ID No. 11)

Vị trí nucleotit	Mô tả và tài liệu tham khảo
461-1003	Gen khởi đầu 35S của virus gây bệnh khảm ở cải hoa
1004-1011	Các trình tự thu được từ vùng đa nối tổng hợp
1012-1563	Gen <i>pat</i> tổng hợp (trình tự axit amin của <i>Streptomyces viridochromogenes</i>)
1564-1581	Các trình tự thu được từ vùng đa nối tổng hợp
1582-1784	Gen kết thúc 35S của virus gây bệnh khảm ở cải hoa

1.4. Sự kiện EE-GM1

1.4.1 Nhận dạng EE-GM1

Đỗ tương chịu được thuốc diệt cỏ được phát triển bằng cách biến nạp đỗ tương bởi vector pB2/P35SAcK bằng cách áp dụng kỹ thuật chuyển gen trực tiếp.

Sự kiện ưu tú EE-GM1 được chọn lọc trên cơ sở quy trình chọn lọc bao quát trên cơ sở khả năng biểu hiện tốt và tính ổn định của gen chịu được thuốc diệt cỏ và tính tương thích của chúng với các đặc tính nông học tối ưu.

1.4.2 Nhận dạng các vùng bên sườn và ADN lạ của sự kiện ưu tú EE-GM1

1.4.2.1. Vùng bên sườn phải (đầu tận cùng 5')

Đoạn được nhận dạng là chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' được giải trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 12. Trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 209 tương ứng với ADN của cây trồng, trong khi trình tự từ nucleotit 210 đến nucleotit 720 tương ứng với ADN lạ.

1.4.2.2. Vùng bên sườn trái (đầu tận cùng 3')

Đoạn được nhận dạng là chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' được giải trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 13. Trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 568 tương ứng với ADN lạ, trong khi trình tự từ nucleotit 569 đến nucleotit 1000 tương ứng với ADN của cây trồng.

1.4.2.3. ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM1

Bằng cách áp dụng các kỹ thuật phân tử khác nhau, đã xác định được rằng ADN lạ của sự kiện ưu tú EE-GM1 chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ chứa hai bản sao của gen *pat* nằm trong cấu trúc lặp trực tiếp (xem Fig.3).

Do đó, ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM1 lần lượt chứa các trình tự sau:

- từ nucleotit 1 đến nucleotit 3122: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 từ nucleotit 340 đến nucleotit 3461;
- từ nucleotit 3123 đến nucleotit 3458: trình tự nucleotit tương ứng với phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 từ nucleotit 1 đến nucleotit 336;
- từ nucleotit 3459 đến nucleotit 4073: trình tự nucleotit tương ứng với phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 từ nucleotit 3462 đến nucleotit 4076; và
- từ nucleotit 4074 đến nucleotit 6780: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 từ nucleotit 337 đến nucleotit 3043; và
- từ nucleotit 6781 đến nucleotit 6790: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 559 đến nucleotit 568 (trình tự này không tương ứng với cả ADN của plasmid hay ADN của cây trồng loại đại và do đó được chỉ định là ADN điền đầy).

ADN lạ này của EE-GM1 nằm ngay trước và liền kề với ADN lạ trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' của SEQ ID No. 12 từ nucleotit 1 đến 209 và nằm ngay sau và liền kề với ADN lạ trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của SEQ ID No. 13 từ nucleotit 569 đến nucleotit 1000.

1.5. Sự kiện EE-GM2

Đỗ tương chịu được thuốc diệt cỏ được phát triển bằng cách biến nạp đỗ tương bởi vectơ pB2/P35SAcK bằng cách áp dụng kỹ thuật chuyển gen trực tiếp.

Sự kiện ưu tú EE-GM2 được chọn lọc trên cơ sở quy trình chọn lọc bao quát trên cơ sở khả năng biểu hiện tốt và tính ổn định của gen chịu được thuốc diệt cỏ và tính tương thích của chúng với các đặc tính nông học tối ưu.

1.5.1. Nhận dạng các vùng bên sườn và ADN lạ của sự kiện ưu tú EE-GM2

1.5.1.1. Vùng bên sườn phải (đầu tận cùng 5')

Đoạn được nhận dạng là chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' được giải trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 14. Trình tự từ nucleotit 1 và 311 tương ứng với ADN của cây trồng, trong khi trình tự từ nucleotit 312 và 810 tương ứng với ADN lạ.

1.5.1.2. Vùng bên sườn trái (đầu tận cùng 3')

Đoạn được nhận dạng là chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' được giải trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID No. 15. Trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 507 tương ứng với ADN lạ, trong khi trình tự từ nucleotit 569 và 1880 tương ứng với ADN của cây trồng.

1.5.1.3. ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ EE-GM2

Bằng cách áp dụng các kỹ thuật phân tử khác nhau, đã xác định được rằng ADN lạ của sự kiện ưu tú EE-GM2 chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ chứa một bản sao của gen *pat* khảm (xem Fig.4).

Do đó, ADN lạ chứa các gen chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM2 lần lượt chứa các trình tự sau:

- từ nucleotit 1 đến nucleotit 391: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 từ nucleotit 3458 đến nucleotit 3848; và
- từ nucleotit 392 đến nucleotit 3436: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 từ nucleotit 413 đến nucleotit 3457.

ADN lạ này của EE-GM2 nằm ngay trước và liền kề với ADN lạ trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến 311 và nằm ngay sau và liền kề với ADN lạ trong trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880.

2. Phát triển quy trình nhận dạng nhờ phản ứng chuỗi polymeraza đối với EE-GM3.

2.1. Các đoạn môi

Các đoạn môi đặc hiệu mà nhận dạng các trình tự trong sự kiện ưu tú được phát triển.

Một đoạn môi mà nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM3 được phát triển. Sau đó, đoạn môi thứ hai được chọn trong trình tự của ADN lạ sao cho các đoạn môi trải dài trên trình tự có khoảng 263 nucleotit. Đã thấy rằng các đoạn môi sau có kết quả đặc biệt rõ ràng và lặp lại được trong phản ứng PCR đối với ADN của EE-GM3:

SOY028: 5'-ATC.gCT.TTA.ACg.TCC.CTC.Ag -3 (SEQ ID No. 4)

(đích: ADN cài xen)

SOY029: 5'-CAA.ggC.CTC.gAg.ATT.ATC -3' (SEQ ID No. 5)

(đích: ADN của cây trồng)

Các đoạn môi hướng đến đích là trình tự nội sinh được ưu tiên nằm trong hỗn hợp PCR. Các đoạn môi này nhằm là nội đối chứng ở mẫu chưa biết và ở đối chứng ADN dương. Kết quả dương tính với cặp đoạn môi nội sinh (có mặt đoạn đã được khuếch đại nhờ PCR có 413 cặp bazơ) chỉ ra rằng có nhiều ADN với chất lượng thích hợp trong chế phẩm ADN hệ gen để tạo ra sản phẩm PCR. Các đoạn môi nội sinh được chọn lọc để nhận dạng gen actin nội sinh của đối tượng:

SOY01 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT -3' (SEQ ID No. 9)

SOY02 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.ee -3' (SEQ ID No. 10)

2.2. Các đoạn đã được khuếch đại

Các đoạn đã được khuếch đại được mong đợi trong phản ứng PCR là:

Đối với cặp đoạn môi SOY01 -SOY02: 413 cặp bazơ (đối chứng nội sinh)

Đối với cặp đoạn môi SOY028-SOY029: 263 cặp bazơ (sự kiện ưu tú EE-GM3)

2.3. ADN mẫu

ADN mẫu được chuẩn bị từ mẫu lá theo Edwards et al. (*Nucleic Acid Research*, 19, p1349, 1991). Khi sử dụng ADN đã được tạo ra theo các phương pháp khác, nên tiến hành chế độ thử nghiệm sử dụng các lượng mẫu khác nhau. Thông thường, 50ng ADN mẫu hệ gen cho các kết quả tốt nhất.

2.4. Các đối chứng dương và đối chứng âm được chỉ định

Để tránh lỗi tích cực hoặc tiêu cực, đã xác định được rằng các đối chứng dương và âm sau nên được có trong một chế độ PCR:

- Đối chứng hỗn hợp chính (đối chứng ADN âm). Đây là PCR mà trong đó ADN không được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Kết quả mong đợi quan sát được không phải là các sản phẩm PCR chỉ ra rằng hỗn hợp PCR không bị lẫn với ADN đích.
- Đối chứng ADN dương (mẫu ADN hệ gen đã biết là chứa các trình tự chuyển gen). Việc khuếch đại thành công đối chứng dương này chỉ ra rằng PCR đã được thực hiện trong các điều kiện cho phép khuếch đại các trình tự đích.
- Đối chứng ADN loại đại. Đây là PCR trong đó ADN mẫu được cung cấp là ADN hệ gen đã được tạo ra từ cây không được chuyển gen. Khi kết quả mong đợi, không khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà khuếch đại sản phẩm PCR nội sinh, được quan sát thì kết quả này chỉ ra rằng không có hiện tượng khuếch đại nền gen chuyển ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

2.5. Các điều kiện PCR

Các kết quả tối ưu thu được trong các điều kiện sau (Trong khi mô tả thì các điều kiện khác nhau để đạt được kết quả tối ưu chỉ nhằm cung cấp ví dụ cho các điều kiện như vậy. Rõ ràng rằng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thay đổi các điều kiện, các chất phản ứng và thông số như sử dụng các polymeraza Taq khác chẳng hạn, và đạt được kết quả mong đợi):

- hỗn hợp PCR trong 25 μ l hỗn hợp phản ứng chứa:

20ng ADN mẫu

2,5 μ l 10x dung dịch đệm khuếch đại (do nhà sản xuất cung cấp cùng với polymeraza Taq)

0,5 μ l dNTP 10mM

0,4 μ l SOY01 (10pmol/ μ l)

0,4 μ l SOY02 (10pmol/ μ l)

0,7 μ l SOY028 (10pmol/ μ l)

0,7 μ l SOY029 (10pmol/ μ l)

0,1µl polymeraza ADN TAq (5 đơn vị/µl)

Nước tối đa 25µl

- profin chu trình nhiệt độ cần được tuân theo để đạt kết quả tối ưu là như sau

4 phút ở 95°C

Tiếp đó: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp đó: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 25 chu kỳ

Tiếp đó: 10 phút ở 72°C

2.6. Phân tích gel agarosa

Để quan sát được bằng mắt thường một cách tối ưu các kết quả của PCR, đã xác định được rằng từ 10 đến 20µl mẫu PCR nên được phủ lên gel agarosa 1,5% (dung dịch đệm Tris-borat) với chỉ thị phân tử lượng thích hợp (ví dụ, thang 100 cặp bazơ Pharmacia).

2.7. Xác nhận kết quả

Đã xác định được rằng dữ liệu từ các mẫu ADN của cây trồng chuyển gen trong một chế độ PCR và một hỗn hợp PCR không được chấp nhận trừ khi 1) đối chứng ADN dương thể hiện các sản phẩm PCR mong đợi (các đoạn chuyển gen và các đoạn nội sinh), 2) đối chứng ADN âm là âm tính đối với bước khuếch đại PCR (không đoạn nào) và 3) đối chứng ADN loại đại thể hiện kết quả mong đợi (khuếch đại đoạn nội sinh).

Khi tuân theo Quy trình nhận dạng theo PCR đối với EE-GM3 như nêu trên, các làn thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và sản phẩm PCR nội sinh với kích thước mong đợi, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN mẫu hệ gen

được tạo ra, đã di truyền sự kiện ưu tú EE-GM3. Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR nội sinh, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN mẫu hệ gen được tạo ra, không mang sự kiện ưu tú. Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của cả sản phẩm PCR nội sinh và sản phẩm PCR chuyển gen chỉ ra rằng chất lượng và/hoặc số lượng ADN hệ gen không cho phép tạo ra sản phẩm PCR. Các cây này sẽ không được tính đến. Việc tạo ra ADN hệ gen cần được lặp lại và chế độ PCR mới cần được thực hiện với các đôi chứng thích hợp.

2.8. Áp dụng quy trình PCR phân biệt để nhận dạng EE-GM3

Trước khi cố gắng sàng lọc các sự kiện chưa biết, nên tiến hành chế độ thử nghiệm với tất cả các đôi chứng thích hợp. Quy trình đã phát triển có thể cần đến bước tối ưu hóa đối với các thành phần mà có thể khác nhau giữa các phòng thí nghiệm (chế phẩm ADN mẫu, polymeraza ADN TAq, chất lượng của các đoạn môi, dNTP's, chu trình nhiệt độ, v.v.).

Bước khuếch đại trình tự nội sinh giữ vai trò then chốt trong quy trình này. Phải đạt được các điều kiện PCR và các điều kiện chu trình nhiệt độ khuếch đại các lượng đẳng mol của cả trình tự nội sinh và trình tự chuyển gen trong mẫu ADN hệ gen chuyển gen đã biết. Một khi đoạn nội sinh đích không được khuếch đại hoặc một khi các trình tự đích không được khuếch đại với cùng cường độ nhuộm ethidi bromua, như được đánh giá theo phương pháp điện di gel agarosa, thì cần phải tối ưu hóa các điều kiện PCR.

Nguyên liệu lá từ một số cây đỗ tương, một vài cây trong số đó mang EE-GM3, được thử nghiệm theo quy trình nêu trên. Các mẫu từ sự kiện ưu tú EE-GM3 và mẫu từ đỗ tương loại đại lẫn lượt được lấy làm đối chứng dương và đối chứng âm.

Fig.2 minh họa kết quả thu được theo Quy trình nhận dạng theo PCR sự kiện ưu tú đối với EE-GM3 ở một số mẫu cây đỗ tương. Đã thấy rằng các mẫu ở làn 2 và làn 3 mang sự kiện ưu tú EE-GM3 vì phát hiện được dải có 263 cặp bazơ, trong khi các mẫu trong các làn 4 đến 8 không mang EE-GM3. Làn 6 và làn 7 chứa các mẫu từ các sự kiện biến nạp đỗ tương khác thu được bằng cách sử dụng cùng các gen khả năng chịu được thuốc diệt cỏ; làn 8 chứa ADN từ các cây đỗ tương loại đại và làn 9 thể hiện mẫu (nước) đối chứng âm, làn 1 và làn 10 thể hiện chỉ thị phân tử lượng (thang 100 cặp bazơ).

2.9. Thử nghiệm dPCR để phát hiện EE-GM3 trong đồng hạt

Thử nghiệm PCR phân biệt (discriminating PCR - dPCR) được thiết lập để phát hiện sự có mặt ở mức thấp của EE-GM3 trong đồng hạt. Lượng hạt chuyển gen tối thiểu 0,4% (khối lượng/khối lượng) trong đồng hạt không chuyển gen đã được phát hiện một cách thành công trong các điều kiện lặp lại. Do đó, Giới hạn phát hiện được xác định là 0,4% (khối lượng/khối lượng).

Các đoạn mồi sau được dùng trong phản ứng PCR đích này:

Đoạn mồi thuận hướng đến đích là trình tự ADN T:

SHA130 5' - CTA.TAT.TCT.ggT.TCC.AAT.TTA.TC -3' (SED ID No.:12)

Đoạn mồi nghịch hướng đến đích là trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3':

SMP178 5' - TgA.ggC.ACg.TAT.TgA.TgA.CC - 3' (SEQ ID No. 13)

Đoạn đã được khuếch đại được mong đợi trong phản ứng PCR từ các đoạn mồi này là 115 cặp bazơ.

Phản ứng PCR đích được thực hiện trên khoảng 200ng ADN mẫu được tạo ra từ đồng hạt dưới đất theo bộ kit tinh chế chiết ADN Gentra Puregene đã được biến đổi (do Qiagen cung cấp). Khi sử dụng ADN đã được tạo ra theo các phương pháp khác, thì nên tiến hành chế độ thử nghiệm sử dụng các mẫu với lượng tương đối đã biết của EE-GM3.

Tốt nhất, phản ứng PCR hệ quy chiếu đã được xác minh, hướng đích trình tự nội sinh, nên được thực hiện theo từng chế độ PCR riêng rẽ để xác minh tính phù hợp của mẫu ADN đối với phân tích PCR nhằm tránh các kết quả sai tiêu cực.

Đối với các mẫu thử nghiệm chưa biết thì tốt nhất là thử nghiệm PCR nên bao gồm các mẫu đối chứng dương và âm thích hợp, tức là:

- Đối chứng hỗn hợp chính (đối chứng ADN âm). Đây là PCR trong đó ADN không được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Kết quả mong đợi (không có sản phẩm PCR) quan sát được đối với cả đích và phản ứng hệ quy chiếu chỉ ra rằng hỗn hợp PCR không bị lẫn với ADN đích.

- Đối chứng ADN dương (mẫu ADN hệ gen đã biết là chứa các trình tự chuyển gen). Việc khuếch đại thành công đối chứng dương này chỉ ra rằng PCR đã được thực hiện trong các điều kiện cho phép khuếch đại các trình tự đích.

- Tương tự, đối chứng ADN loại đại cũng có thể được bổ sung vào PCR này. Đây là PCR trong đó ADN mẫu được cung cấp là ADN hệ gen tạo ra được từ cây không chuyển gen. Khi kết quả mong đợi, không khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà khuếch đại sản phẩm PCR nội sinh, quan sát được thì kết quả này chỉ ra rằng không có hiện tượng khuếch đại nền gen chuyển ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

Các kết quả tối ưu thu được trong các điều kiện sau:

- hỗn hợp PCR cho 25 μ l hỗn hợp phản ứng chứa:

200ng ADN mẫu

5 μ l 5x dung dịch đệm phản ứng

0,25 μ l dNTP 20mM

0,7 μ l SHA130 (10pmol/l)

0,4 μ l SMP178 (10pmol/l)

0,1 μ l GO-Taq DNA polymeraza (5 đơn vị/l)

Bổ sung nước tối đa 25 μ l

- profin chu trình nhiệt độ cần được tuân theo để đạt kết quả tối ưu là như sau:

4 phút ở 95°C

Tiếp đó: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp đó: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 30 chu kỳ

Tiếp đó: 10 phút ở 72°C

Để quan sát được bằng mắt thường một cách tối ưu các kết quả của PCR, đã xác định được rằng nên dùng 25 μ l sản phẩm PCR trên gel agarosa 1,5% (dung dịch đệm Tris-borat) với chỉ thị phân tử lượng thích hợp (ví dụ, thang 50 cặp bazơ).

Khi tuân theo phương pháp PCR như nêu trên, các lần thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR đích và các sản phẩm PCR hệ quy chiếu với kích thước mong đợi chỉ ra rằng mẫu thử nghiệm mà từ đó ADN mẫu hệ gen được tạo ra mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với lượng lớn hơn giới hạn phát hiện của phản ứng đích.

Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR đích nhưng thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR hệ quy chiếu, chỉ ra rằng mẫu thử nghiệm mà từ đó ADN mẫu hệ gen được tạo ra mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với lượng cao hơn giới hạn phát hiện của phản ứng đích.

Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của cả sản phẩm PCR nội sinh và sản phẩm PCR chuyển gen, chỉ ra rằng chất lượng và/hoặc số lượng ADN hệ gen không cho phép tạo ra sản phẩm PCR. Cây này sẽ không được tính đến. Việc tạo ra ADN hệ gen nên được lặp lại và cần phải thực hiện chế độ PCR mới với các đối chứng thích hợp.

3. Sử dụng đoạn hợp nhất đặc hiệu làm mẫu dò để phát hiện nguyên liệu mang EE-GM3

Đoạn hợp nhất đặc hiệu mang EE-GM3 thu được bằng cách khuếch đại theo PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu SOY028 (SEQ ID No. 4) và SOY029 (SEQ ID No. 5) tạo ra đơn vị siêu sao chép có trình tự nucleotit của SEQ ID No. 8 hoặc theo quy trình tổng hợp hóa học và được đánh dấu. Đoạn hợp nhất này được sử dụng làm mẫu dò đặc hiệu để phát hiện EE-GM3 trong các mẫu sinh phẩm. Axit nucleic được chiết từ các mẫu theo các quy trình chuẩn. Sau đó, axit nucleic này được cho tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu trong các điều kiện lai mà đã được tối ưu hóa để cho phép tạo ra thể lai. Tiếp theo, sự tạo ra thể lai được phát hiện để chỉ ra sự có mặt của axit nucleic của EE-GM3 trong mẫu. Tùy ý, axit nucleic trong mẫu này được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu trước khi tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu. Theo cách khác, axit nucleic này được đánh dấu trước khi tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu chứ không phải là đoạn hợp nhất. Tùy ý, mẫu dò đặc hiệu được hợp nhất vào chất mang rắn (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bộ lọc, dải hoặc hạt), trước khi tiếp xúc với các mẫu.

4. Quy trình nhận dạng phản ứng chuỗi polymeraza đối với EE-GM1

4.1. Các đoạn mồi

Các đoạn mồi đặc hiệu mà nhận dạng các trình tự trong sự kiện ưu tú được phát triển. Cụ thể hơn, đoạn mồi mà nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM1 được phát triển. Sau đó, đoạn mồi thứ hai được chọn lọc trong trình tự của ADN lạ sao cho các đoạn mồi trải dài trên trình tự có khoảng 183 nucleotit. Đã thấy rằng các đoạn mồi sau cho kết quả đặc biệt rõ ràng và lặp lại được trong phản ứng PCR trên ADN của EE-GM1:

SOY06: 5'- ggC.gTT.CgT.AgT.gAC.TgA.gg -3' (SEQ ID No. 16)

(đích: ADN của cây trồng)

SOY07: 5'-gTT.TTA.CAA.CgT.CgT.gAC.Tgg-3' (SEQ ID No. 17)

(đích: ADN cài xen)

Tốt hơn nếu hỗn hợp PCR gồm các đoạn mồi hướng đích trình tự nội sinh. Các đoạn mồi này nhằm làm nội đối chứng ở mẫu chưa biết và ở đối chứng ADN dương. Kết quả tích cực với cặp đoạn mồi nội sinh chỉ ra rằng có nhiều ADN với chất lượng thích hợp trong chế phẩm ADN hệ gen để tạo ra sản phẩm PCR. Các đoạn mồi nội sinh được chọn lọc để nhận dạng gen giữ nhà trong *Glycine max*:

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID No. 9)

(nằm ở gen *Glycine max* actin 1 (số hiệu lưu giữ J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID No. 10)

(nằm ở gen *Glycine max* actin 1 (số hiệu lưu giữ J01298))

4.2. Các đoạn đã được khuếch đại

Các đoạn đã được khuếch đại được mong đợi trong phản ứng PCR là:

Đối với cặp đoạn mồi SOY01-SOY02: 413 cặp bazơ (đối chứng nội sinh)

Đối với cặp đoạn mồi SOY06-SOY07: 183 cặp bazơ (sự kiện ưu tú EE-GM1)

4.3. ADN mẫu

ADN mẫu được tạo ra từ mẫu lá theo Edwards et al. (*Nucleic Acid Research*, 19, p1349, 1991). Khi sử dụng ADN tạo ra được theo các phương pháp khác, nên tiến hành chế độ thử nghiệm sử dụng các lượng mẫu khác nhau. Thông thường, 50ng ADN mẫu hệ gen cho các kết quả tốt nhất.

4.4. Các đối chứng dương và đối chứng âm được chỉ định

Để tránh lỗi tích cực hoặc tiêu cực, đã xác định được rằng các đối chứng dương và âm sau nên được có trong chế độ PCR:

- Đối chứng hỗn hợp chính (đối chứng ADN âm). Đây là PCR trong đó ADN không được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Kết quả mong đợi quan sát được không phải là các sản phẩm PCR chỉ ra rằng hỗn hợp PCR không bị lẫn với ADN đích.
- Đối chứng ADN dương (mẫu ADN hệ gen đã biết là chứa các trình tự chuyển gen). Việc khuếch đại thành công đối chứng dương này cho thấy rằng PCR đã được thực hiện trong các điều kiện cho phép khuếch đại các trình tự đích.
- Đối chứng ADN loại đại. Đây là PCR trong đó ADN mẫu được cung cấp là ADN hệ gen tạo ra được từ cây không chuyển gen. Khi kết quả mong đợi, không khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà khuếch đại sản phẩm PCR nội sinh được quan sát thì kết quả này cho thấy rằng không có hiện tượng khuếch đại nền gen chuyển ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

4.5. Các điều kiện PCR

Các kết quả tối ưu thu được trong các điều kiện sau:

- hỗn hợp PCR cho 25µl hỗn hợp phản ứng chứa:

2,5µl ADN mẫu

2,5µl 10x dung dịch đệm khuếch đại (được cung cấp cùng với polymeraza Taq)

0,5µl dNTP's 10mM

0,5µl SOY06 (10pmol/µl)

0,5µl SOY07 (10pmol/µl)

0,25µl SOY01 (10pmol/µl)

0,25µl SOY02 (10pmol/µl)

0,1 μ l polymeraza ADN TAq (5 đơn vị/ μ l)

nước tối đa 25 μ l

- profin chu trình nhiệt độ cần được tuân theo để đạt kết quả tối ưu là như sau:

4 phút ở 95°C

Tiếp đó: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp đó: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 25 chu kỳ

Tiếp đó: 5 phút ở 72°C

4.6. Phân tích gel agarosa

Để quan sát được bằng mắt thường một cách tối ưu các kết quả của PCR, đã xác định được rằng nên dùng từ 10 đến 20 μ l mẫu PCR trên gel agarosa 1,5% (dung dịch đệm Tris-borat) với chỉ thị phân tử lượng thích hợp (ví dụ, thang 100 cặp bazơ Pharmacia).

4.7. Xác minh kết quả

Đã xác định được rằng dữ liệu từ các mẫu ADN của cây trồng chuyển gen trong một chế độ PCR và một hỗn hợp PCR không nên được chấp nhận trừ khi 1) đối chứng ADN dương thể hiện các sản phẩm PCR mong đợi (các đoạn chuyển gen và các đoạn nội sinh), 2) đối chứng ADN âm là âm tính đối với bước khuếch đại PCR (không đoạn nào) và 3) đối chứng ADN loại đại thể hiện kết quả mong đợi (khuếch đại đoạn nội sinh).

Khi tuân theo Quy trình nhận dạng theo PCR đối với EE-GM1 như nêu trên, các làn thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và sản phẩm PCR

nội sinh với kích thước mong đợi, cho thấy rằng cây tương ứng mà từ đó ADN mẫu hệ gen được tạo ra, đã di truyền sự kiện ưu tú EE-GM1. Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR nội sinh, cho thấy rằng cây tương ứng mà từ đó ADN mẫu hệ gen được tạo ra, không mang sự kiện ưu tú. Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của cả sản phẩm PCR nội sinh và sản phẩm PCR chuyển gen cho thấy rằng chất lượng và/hoặc số lượng ADN hệ gen không cho phép tạo ra sản phẩm PCR. Cây này sẽ không được tính đến. Việc tạo ra ADN hệ gen nên được lặp lại và cần phải thực hiện chế độ PCR mới với các đối chứng thích hợp.

4.8. Áp dụng quy trình PCR phân biệt để nhận dạng EE-GM1

Trước khi cố gắng sàng lọc các sự kiện chưa biết, cần thực hiện chế độ thử nghiệm với tất cả các đối chứng thích hợp. Quy trình đã phát triển có thể cần đến bước tối ưu hóa đối với các thành phần mà có thể là khác nhau giữa các phòng thí nghiệm (chế phẩm ADN mẫu, polymeraza ADN TAq, chất lượng của các đoạn môi, dNTP's, chu trình nhiệt độ, v.v.).

Bước khuếch đại trình tự nội sinh giữ vai trò then chốt trong quy trình này. Phải đạt được các điều kiện PCR và các điều kiện chu trình nhiệt độ mà khuếch đại các lượng đẳng mol của cả trình tự nội sinh và trình tự chuyển gen trong mẫu ADN hệ gen chuyển gen đã biết. Mỗi khi đoạn nội sinh đích không được khuếch đại hoặc mỗi khi các trình tự đích không được khuếch đại với cùng cường độ nhuộm ethiđi bromua, như được đánh giá theo phương pháp điện di gel agarosa, thì có thể cần phải tối ưu hóa các điều kiện PCR.

Nguyên liệu lá *Glycine max* từ một số cây, một vài trong số đó mang EE-GM1, được thử nghiệm theo quy trình nêu trên. Các mẫu từ sự kiện ưu tú EE-GM1 và các mẫu từ *Glycine max* loại đại lần lượt được lấy làm đối chứng dương và đối chứng âm.

Fig.5 minh họa kết quả thu được theo Quy trình nhận dạng theo PCR sự kiện ưu tú đối với EE-GM1 trên một số mẫu cây đỗ tương (các lần 1 đến 14). Đã thấy rằng các mẫu trên lần 1 mang sự kiện ưu tú vì phát hiện được dải có 185 cặp bazơ, trong khi các mẫu trên các lần 2, 3 và 4 không mang EE-GM1. Lần 2 mang một sự kiện ưu tú khác của đỗ

tương, làn 3 là đối chứng *Glycine max* không chuyển gen; làn 4 là mẫu (nước) đối chứng âm, và làn 5 là chỉ thị phân tử lượng (100 cặp bazơ).

5. Sử dụng đoạn hợp nhất đặc hiệu làm mẫu dò để phát hiện nguyên liệu mang EE-GM1

Đoạn hợp nhất đặc hiệu mang EE-GM1 thu được bằng cách khuếch đại theo PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu SOY06 (SEQ ID No. 16) và SOY07 (SEQ ID No. 17) hoặc theo quy trình tổng hợp hóa học, và được đánh dấu. Đoạn hợp nhất này được sử dụng làm mẫu dò đặc hiệu để phát hiện EE-GM1 trong các mẫu sinh phẩm. Axit nucleic được chiết từ các mẫu theo các quy trình chuẩn. Sau đó, axit nucleic này được cho tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu trong các điều kiện lai mà đã được tối ưu hóa để cho phép tạo ra thể lai. Tiếp theo, sự tạo ra thể lai được phát hiện để chỉ ra sự có mặt của axit nucleic EE-GM1 trong mẫu. Tùy ý, axit nucleic trong mẫu này được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu trước khi tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu. Theo cách khác, axit nucleic này được đánh dấu trước khi tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu chứ không phải là đoạn hợp nhất. Tùy ý, mẫu dò đặc hiệu được hợp nhất vào chất mang rắn (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bộ lọc, dải hoặc hạt), trước khi tiếp xúc với các mẫu.

6. Quy trình nhận dạng theo phản ứng chuỗi polymeraza đối với EE-GM2

6.1. Các đoạn mồi

Các đoạn mồi đặc hiệu nhận dạng trình tự trong sự kiện ưu tú được phát triển. Cụ thể hơn, đoạn mồi nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM2 được phát triển. Sau đó, đoạn mồi thứ hai được chọn lọc trong trình tự của ADN lạ sao cho các đoạn mồi trải dài trên trình tự có khoảng 150 nucleotit. Đã thấy rằng các đoạn mồi sau cho kết quả đặc biệt rõ ràng và lặp lại được trong phản ứng PCR trên ADN của EE-GM2:

SOY09: 5'- TgT.ggT.TAT.ggC.ggT.gCC.ATC -3' (SEQ ID No. 18)

(đích: ADN của cây trồng)

SOY010: 5'-TgC.TAC.Agg.CAT.CgT.ggT.gTC-3' (SEQ ID No. 19)

(đích: ADN cài xen)

Tốt hơn nếu hỗn hợp PCR gồm các đoạn môi hướng đích trình tự nội sinh. Các đoạn môi này nhằm làm nội đối chứng ở các mẫu chưa biết và ở đối chứng ADN dương. Kết quả dương tính với cặp đoạn môi nội sinh chỉ ra rằng có nhiều ADN với chất lượng thích hợp trong chế phẩm ADN hệ gen để tạo ra sản phẩm PCR. Các đoạn môi nội sinh được chọn lọc để nhận dạng gen giữ nhà ở *Glycine max*:

SOY01: 5'-gTC.AgC.CAC.ACA.gTg.CCT.AT-3' (SEQ ID No. 9)

(nằm ở gen *Glycine max* actin 1 (số hiệu lưu giữ J01298))

SOY02: 5'-gTT.ACC.gTA.CAg.gTC.TTT.CC-3' (SEQ ID No. 10)

(nằm ở gen *Glycine max* actin 1 (số hiệu lưu giữ J01298))

6.2. Các đoạn đã được khuếch đại

Các đoạn đã được khuếch đại được mong đợi trong phản ứng PCR là:

Đối với cặp đoạn môi SOY01 -SOY02: 413 cặp bazơ (đối chứng nội sinh)

Đối với cặp đoạn môi SOY09-SOY010: 151 cặp bazơ (sự kiện ưu tú EE-GM2)

6.3. ADN mẫu

ADN mẫu được tạo ra từ mẫu lá theo Edwards et al. (*Nucleic Acid Research*, 19, p1349, 1991). Khi sử dụng ADN tạo ra được theo các phương pháp khác, nên tiến hành chế độ thử nghiệm sử dụng các lượng mẫu khác nhau. Thông thường, 50ng ADN mẫu hệ gen cho kết quả tốt nhất.

6.4. Các đối chứng dương và đối chứng âm được chỉ định

Để tránh lỗi tích cực hoặc tiêu cực, đã xác định được rằng các đối chứng dương và đối chứng âm sau nên được có trong chế độ PCR:

- Đối chứng hỗn hợp chính (đối chứng ADN âm). Đây là PCR trong đó ADN không được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Kết quả mong đợi quan sát được không phải là các sản phẩm PCR cho thấy rằng hỗn hợp PCR không bị lẫn với ADN đích.

- Đối chứng ADN dương (mẫu ADN hệ gen đã biết là chứa các trình tự chuyển gen). Việc khuếch đại thành công đối chứng dương này cho thấy rằng PCR đã được thực hiện trong các điều kiện cho phép khuếch đại các trình tự đích.

- Đối chứng ADN loại đại. Đây là PCR trong đó ADN mẫu được cung cấp là ADN hệ gen tạo ra được từ cây không chuyển gen. Khi kết quả mong đợi, không khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà khuếch đại sản phẩm PCR nội sinh, được quan sát thì kết quả này cho thấy rằng không có hiện tượng khuếch đại nền gen chuyển ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

6.5. Các điều kiện PCR

Các kết quả tối ưu thu được trong các điều kiện sau:

- hỗn hợp PCR cho 25 μ l hỗn hợp phản ứng chứa:

2,5 μ l ADN mẫu

2,5 μ l 10x dung dịch đệm khuếch đại (được cung cấp cùng với polymeraza Taq)

0,5 μ l dNTP's 10mM

0,5 μ l SOY09 (10pmol/ μ l)

0,5 μ l SOY010 (10pmol/ μ l)

0,25 μ l SOY01 (10pmol/ μ l)

0,25 μ l SOY02 (10pmol/ μ l)

0,1 μ l polymeraza ADN TAq (5 đơn vị/ μ l)

nước tối đa 25 μ l

- profin chu trình nhiệt độ cần được tuân theo để đạt kết quả tối ưu là như sau:

4 phút ở 95°C

Tiếp đó: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp đó: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 25 chu kỳ

Tiếp đó: 5 phút ở 72°C

6.6. Phân tích gel agarosa

Để quan sát được bằng mắt thường một cách tối ưu các kết quả của PCR, đã xác định được rằng nên dùng từ 10 đến 20µl mẫu PCR trên gel agarosa 1,5% (dung dịch đệm Tris-borat) với chỉ thị phân tử lượng thích hợp (ví dụ, thang 100 cặp bazơ Pharmacia).

6.7. Xác minh kết quả

Đã xác định được rằng dữ liệu từ các mẫu ADN của cây trồng chuyển gen trong một chế độ PCR và một hỗn hợp PCR không nên được chấp nhận trừ khi 1) đối chứng AND dương thể hiện các sản phẩm PCR mong đợi (các đoạn chuyển gen và các đoạn nội sinh), 2) đối chứng ADN âm là âm tính đối với bước khuếch đại PCR (không đoạn nào) và 3) đối chứng ADN loại đại thể hiện kết quả mong đợi (khuếch đại đoạn nội sinh).

Khi tuân theo Quy trình nhận dạng theo PCR đối với EE-GM2 như nêu trên, các lần thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và sản phẩm PCR nội sinh với kích thước mong đợi, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN mẫu hệ gen đã được tạo ra, đã di truyền sự kiện ưu tú EE-GM2. Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR nội sinh, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN mẫu hệ gen đã được tạo ra không mang sự kiện ưu tú. Các lần không thể hiện lượng nhìn thấy được của cả sản phẩm PCR nội sinh và sản phẩm PCR chuyển gen, chỉ ra rằng chất lượng và/hoặc số lượng ADN hệ gen không cho phép tạo ra sản phẩm PCR. Các cây này sẽ không được tính đến. Việc tạo ra ADN hệ gen nên được lặp lại và cần phải thực hiện chế độ PCR mới với các đối chứng thích hợp.

6.8. Áp dụng quy trình PCR phân biệt để nhận dạng EE-GM2

Trước khi cố gắng sàng lọc các sự kiện chưa biết, cần phải tiến hành chế độ thử nghiệm với tất cả các đối chứng thích hợp. Quy trình đã phát triển có thể cần đến bước tối ưu hóa đối với các thành phần mà có thể là khác nhau giữa các phòng thí nghiệm (chế

phẩm ADN mẫu, polymeraza ADN TAq, chất lượng của các đoạn môi, dNTP's, chu trình nhiệt độ, v.v.).

Bước khuếch đại trình tự nội sinh giữ vai trò then chốt trong quy trình này. Phải đạt được các điều kiện PCR và các điều kiện chu trình nhiệt độ mà khuếch đại các lượng đẳng mol của cả trình tự nội sinh và trình tự chuyển gen trong mẫu ADN hệ gen chuyển gen đã biết. Mỗi khi đoạn nội sinh đích không được khuếch đại hoặc mỗi khi các trình tự đích không được khuếch đại với cùng cường độ nhuộm ethidi bromua, như được đánh giá theo phương pháp điện di gel agarosa, thì cần phải tối ưu hóa các điều kiện PCR.

Nguyên liệu lá *Glycine max* từ một số cây, một vài trong số đó mang EE-GM2, được thử nghiệm theo quy trình nêu trên. Các mẫu từ sự kiện ưu tú EE-GM2 và mẫu từ *Glycine max* loại đại lẫn lượt được lấy làm đối chứng dương và đối chứng âm.

Fig.6 minh họa kết quả thu được theo Quy trình nhận dạng sự kiện ưu tú theo PCR đối với EE-GM2 trên một số mẫu cây đỗ tương (các làn 1 đến 14). Các mẫu trên làn 1 được thấy là mang sự kiện ưu tú vì phát hiện được dải có 185 cặp bazơ, trong khi các mẫu trên các làn 2, 3 và 4 không mang EE-GM2. Làn 2 mang một sự kiện ưu tú khác của đỗ tương, làn 3 là đối chứng *Glycine max* không chuyển gen; làn 4 là mẫu (nước) đối chứng âm, và làn 5 là chỉ thị phân tử lượng (100 cặp bazơ).

7. Sử dụng đoạn hợp nhất đặc hiệu làm mẫu dò để phát hiện nguyên liệu mang EE-GM2

Đoạn hợp nhất đặc hiệu chứa EE-GM2 thu được bằng cách khuếch đại theo PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu SOY09 (SEQ ID No. 18) và SOY010 (SEQ ID No. 19) hoặc theo quy trình tổng hợp hóa học và được đánh dấu. Đoạn hợp nhất này được sử dụng làm mẫu dò đặc hiệu để phát hiện EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm. Axit nucleic được chiết từ các mẫu theo các quy trình chuẩn. Sau đó, axit nucleic này được cho tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu trong các điều kiện lai mà đã được tối ưu hóa để cho phép tạo ra thể lai. Tiếp theo, sự tạo ra thể lai được phát hiện để chỉ ra sự có mặt của axit nucleic EE-GM2 trong mẫu. Tùy ý, axit nucleic trong mẫu này được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu trước khi tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu. Theo cách khác, axit nucleic này được đánh dấu trước khi tiếp xúc với mẫu dò đặc hiệu chứ không

phải là đoạn hợp nhất. Tùy ý, mẫu dò đặc hiệu được hợp nhất vào chất mang rắn (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, bộ lọc, dải hoặc hạt), trước khi tiếp xúc với các mẫu.

8. Tạo ra cây đổ tương mang EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM3 và EE-GM2 và đánh giá năng suất trồng trọt của các cây này

Cây đổ tương chứa tổ hợp gồm các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 thu được bằng phương pháp lai thông thường giữa cây đổ tương gốc mang EE-GM3 và cây đổ tương gốc mang EE-GM1. Các cây con mang cả hai sự kiện này được nhận dạng bằng cách áp dụng Quy trình nhận dạng theo PCR đối với EE-GM1 và EE-GM3 như được nêu trong bản mô tả này. Cụ thể, bước lai chéo được thực hiện giữa cây mang EE-GM3 và một vài dòng EE-GM1. Các cây F1 thu được được trồng và được phun glyphosat và glufosinat. Hạt F2 được thu từ các cây F1 và được trồng (các cây F2 không được phun). Các cây F2 đơn lẻ được nhỏ. Các hàng cây F2:F3 được trồng và được phun glyphosat và glufosinat. Các hàng đồng hợp tử đối với cả EE-GM3 và EE-GM1 được nhận dạng và sau đó được thu hoạch. Dữ liệu phân tách từ thử nghiệm này thể hiện sự phân tách các sự kiện như mong đợi theo định luật Mendel.

Cây đổ tương chứa tổ hợp gồm các sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 thu được bằng phương pháp lai thông thường giữa cây đổ tương gốc mang EE-GM3 và cây đổ tương gốc chứa EE-GM2. Các cây con mang cả hai sự kiện này được nhận dạng bằng cách áp dụng Quy trình nhận dạng theo PCR đối với EE-GM2 và EE-GM3 như được nêu trong bản mô tả này. Cụ thể, bước lai chéo được thực hiện giữa cây mang EE-GM3 và các cây mang EE-GM2. Các cây F1 thu được được lai chéo với 4 dòng thông thường. Các cây F1 thu được từ bước lai chéo này được trồng trên cánh đồng và được phun glyphosat và glufosinat. Sau đó, hạt F2 thu được từ các cây F1 chịu được cả hai thuốc diệt cỏ được trồng. Các cây F2 được phun cả glyphosat và glufosinat. Thu được chín trăm cây chịu được cả hai thuốc diệt cỏ và chúng được trồng trên cánh đồng thử nghiệm. Thu được dữ liệu phân tách đối với các sự kiện được mong đợi theo định luật Mendel trong thử nghiệm này. Khoảng 40 dòng đồng hợp tử về khả năng chịu được cả hai thuốc diệt cỏ được chọn lọc theo tính đồng nhất về mặt nông học đối với các thử nghiệm tiếp theo. Các dòng này có khả năng chịu được cả hai thuốc diệt cỏ tốt với các đặc tính nông học tốt.

Các thử nghiệm trên cánh đồng với các cây đỗ tương mang các sự kiện kết hợp này trong nhiều loại chất mầm thương mại khác nhau được thực hiện ở nhiều địa điểm và các thông số nông học khác nhau của các cây này được đánh giá, bao gồm chiều cao của cây, chiều cao đến đốt, khả năng đứng vững, sức sống, năng suất hạt, và mức độ chịu được glyphosat, isoxaflutol và glufosinat.

9. Nhập gen của sự kiện EE-GM3 và EE-GM1 hoặc EE-GM2 vào các cây trồng được ưu tiên

Sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM1 hoặc EE-GM2 được đưa vào bằng cách lai chéo ngược lặp lại vào các cây đỗ tương thương mại như, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây đỗ tương 7631014 (US2009252860); cây đỗ tương 7431014 (US2009252859); cây đỗ tương 7925084 (US2009252858); cây đỗ tương 7311153 (US2009252857); cây đỗ tương S070159 (US2009252856); cây đỗ tương 7535357 (US2009246353); cây đỗ tương S070160 (US2009246352); cây đỗ tương 26074414 (US2009249508); cây đỗ tương 7509171 (US2009249507); cây đỗ tương S070158 (US2009246351); cây đỗ tương 7511119 (US2009249506); cây đỗ tương 7113111 (US2009238945); cây đỗ tương S06-02RM018047 (US7592518); cây đỗ tương 7013345 (US2009232957); cây đỗ tương 7041461 (US2009235376); cây đỗ tương 7549450 (US2009232956); cây đỗ tương 7317090 (US2009232955); cây đỗ tương 2N2V58015 (US2009226597); cây đỗ tương 7243182 (US2009226596); cây đỗ tương 7143182 (US2009226595); cây đỗ tương 7043182 (US2009220673); cây đỗ tương S070157 (US2009222950); cây đỗ tương 306924721 (US2009220672); cây đỗ tương 7614385 (US2009220671); cây đỗ tương 7925118 (US2009214750); cây đỗ tương 7821295 (US2009214749); cây đỗ tương 7811336 (US2009214748); cây đỗ tương S070150 (US2009214747); cây đỗ tương 6214260 (US2009214746); cây đỗ tương S070152 (US2009214745); cây đỗ tương 7429331 (US2009214751); cây đỗ tương 26034631 (US2009208634); cây đỗ tương S07-03JR108674 (US7560621); cây đỗ tương S07-03KL016279 (US7560620); cây đỗ tương S06-CL959411 (US7554017); cây đỗ tương SG3870NRR (US2009158453); cây đỗ tương HFPR-G (CA2645702); cây đỗ tương S06-02JR423016 (US7521606); cây đỗ tương S06-01JR119814 (US7518039); cây đỗ tương S06-01JR119448 (US7518038); cây đỗ tương 6540220 (US2009055960); cây đỗ tương S060292 (US2009055959); cây đỗ tương S050228 (US2009055958); cây đỗ

tương S06-02JR423003 (US7491873); cây đỗ tương S06-02JR423005 (US7491872); cây đỗ tương S06-02JR409114 (US7485782); cây đỗ tương S06-SJ144056 (US7473823); cây đỗ tương (US7470835); cây đỗ tương 6910450 (US2008282369); cây đỗ tương 6223012 (US7446246); cây đỗ tương 6549250 (US7446245); cây đỗ tương 17731225 (US2008271204); cây đỗ tương 6928285 (US2008271203); cây đỗ tương 6736054 (US2008271169); cây đỗ tương S060299 (US2008271199); cây đỗ tương S060294 (US2008271202); cây đỗ tương 6943322 (US2008271201); cây đỗ tương 5343260 (US2008263719); cây đỗ tương 6439359 (US2008263704); cây đỗ tương 6238359 (US2008263703); cây đỗ tương 6547272 (US2008263702); cây đỗ tương 6929431 (US2008263701); cây đỗ tương 6703392 (US2008263700); cây đỗ tương 6044483 (US2008263699); cây đỗ tương S050224 (US2008263698); cây đỗ tương 6719022 (US2008263697); cây đỗ tương 5826056 (US2008263696); cây đỗ tương 6265047 (US2008263724); cây đỗ tương 6928331 (US2008263695); cây đỗ tương 6719331 (US2008263694); cây đỗ tương 6636454 (US2008263693); cây đỗ tương 6226454 (US2008263718); cây đỗ tương Q0073801 (US2008256657); cây đỗ tương 6326393 (US2008256652); cây đỗ tương 6408448 (US2008256651); cây đỗ tương 6449315 (US2008250524); cây đỗ tương S060296 (US2008250523); cây đỗ tương 6012078 (US2008250522); cây đỗ tương 6342078 (US2008250521); cây đỗ tương 6419156 (US2008250520); cây đỗ tương 5723264 (US2008250519); cây đỗ tương S050225 (US2008250518); cây đỗ tương S060298 (US2008244783); cây đỗ tương 6935331 (US2008244782); cây đỗ tương 6819456 (US2008244787); cây đỗ tương S060297 (US2008244781); cây đỗ tương 6135319 (US2008244786); cây đỗ tương 6819331 (US2008244780); cây đỗ tương 6137445 (US2008244779); cây đỗ tương 6917445 (US2008244778); cây đỗ tương 6111333 (US2008244777); cây đỗ tương S050229 (US2008244776); cây đỗ tương 6114011 (US2008244775); cây đỗ tương 6900358 (US2008244784); cây đỗ tương 6345184 (US2008244774); cây đỗ tương 6836085 (US2008244773); cây đỗ tương 6635047 (US2008244772); cây đỗ tương 6139105 (US2008244771); cây đỗ tương 6434385 (US2008244770); cây đỗ tương S060295 (US2008244769); cây đỗ tương 6035184 (US2008244768); cây đỗ tương S060293 (US2008209590); cây đỗ tương 6733322 (US2008209594); cây đỗ tương 6421326 (US2008209593); cây đỗ tương S060077 (US2008209589); cây đỗ tương 6600375 (US2008209592); cây đỗ tương S06-CL821457 (US7420104); cây đỗ tương

S07-02KG294306 (US7414178); cây đỗ tương S06-BA046119 (US7414175); cây đỗ tương S07-02KG294307 (US7411114); cây đỗ tương SG3865N (US2008189802); cây đỗ tương 6701475 (US7408097); cây đỗ tương 1335025 (US2008178316); cây đỗ tương 1686017 (US2008178315); cây đỗ tương 2388028 (US2008178314); cây đỗ tương 2387029 (US2008178313); cây đỗ tương S06-WW152330 (US7388129); cây đỗ tương 6424090 (US7385118); cây đỗ tương 6723322 (US7385115); cây đỗ tương SG4377NRR (US7385114); cây đỗ tương S06-02JR111334 (US7381864); cây đỗ tương 6141287 (US7378577); cây đỗ tương MT110501 (US7378576); cây đỗ tương (US7378575); cây đỗ tương S06-WW169267 (US7375261); cây đỗ tương 6223392 (US7371939); cây đỗ tương S06-CL968413 (US7371937); cây đỗ tương S06-CL91107 (US7368636); cây đỗ tương S06-MT9152077 (US7361810); cây đỗ tương 4211676 (US2008092253); cây đỗ tương S06-M059029 (US7355101); cây đỗ tương 6548193 (US7345228); cây đỗ tương 6440261 (US7345227); cây đỗ tương S060291 (US7342151); cây đỗ tương S06-MT9206166 (US7339094); cây đỗ tương S06-WW013107 (US7339093); cây đỗ tương S06-M03256 (US7335820); cây đỗ tương 6134466 (US7332656); cây đỗ tương S06-01JR123373 (US7329800); cây đỗ tương S06-MT9211059 (US7326831); cây đỗ tương 26170838 (US2008016590); cây đỗ tương 306612412 (US2008016588); cây đỗ tương 26660135 (US2008016587); cây đỗ tương 306734323 (US2008016586); cây đỗ tương S06-01JR122235 (US7317144); cây đỗ tương 5900450 (US7314986); cây đỗ tương S06-MT116260 (US7314984); cây đỗ tương S06-SJ143606 (US7312381); cây đỗ tương S06-98181-G01-35167 (US7309819); cây đỗ tương 26082635 (US7304219); cây đỗ tương BA922834 (US7304217); cây đỗ tương 01JR123480 (US7304216); cây đỗ tương M061422 (US7304215); cây đỗ tương 17082821 (US2007277262); cây đỗ tương 17621620 (US2007277261); cây đỗ tương 00977706 (US2007277260); cây đỗ tương S060182 (US2007277259); cây đỗ tương 26312034 (US7301078); cây đỗ tương 26143837 (US7301077); cây đỗ tương 435.TCS (US2007271626); cây đỗ tương 495.RC (US2007271625); cây đỗ tương 5306230 (US7297845); cây đỗ tương S06-WW167686 (US7291772); cây đỗ tương 6141145 (US2007245426); cây đỗ tương S050232 (US2007226829); cây đỗ tương 5333301 (US2007226828); cây đỗ tương S050215 (US2007226827); cây đỗ tương 3235020 (US2007226826); cây đỗ tương 5720482 (US2007226825); cây đỗ tương S050216 (US2007226824); cây đỗ tương 5512112 (US2007226823); cây đỗ tương- 3233021

(US2007226822); cây đỗ tương 1336024 (US2007226821); cây đỗ tương 5348287 (US2007226820); cây đỗ tương 5204220 (US2007226819); cây đỗ tương 6188027 (US2007226818); cây đỗ tương 4183026 (US2007226817); cây đỗ tương S06-WW157958 (US7271325); cây đỗ tương 5733056 (US2007209091); cây đỗ tương 90501911 (US2007209090); cây đỗ tương S050221 (US2007204361); cây đỗ tương 5802205 (US2007204360); cây đỗ tương 1000642 (US2007204359); cây đỗ tương 5420128 (US2007204358); cây đỗ tương S050222 (US2007199094); cây đỗ tương S050217 (US2007199093); cây đỗ tương S050223 (US2007199092); cây đỗ tương S050218 (US2007199091); cây đỗ tương 5419227 (US2007199089); cây đỗ tương 5319227 (US2007199088); cây đỗ tương 5723045 (US2007199087); cây đỗ tương 5051007 (US2007199086); cây đỗ tương 5826175 (US2007192893); cây đỗ tương S050231 (US2007192892); cây đỗ tương 5826376 (US2007192891); cây đỗ tương 5628386 (US2007192890); cây đỗ tương 5138236 (US2007186307); cây đỗ tương 5608398 (US2007186306); cây đỗ tương S050230 (US2007186305); cây đỗ tương 5624126 (US2007180561); cây đỗ tương 5019225 (US2007180560); cây đỗ tương 5549483 (US2007180559); cây đỗ tương 4189010 (US2007180551); cây đỗ tương 1486018 (US2007180550); cây đỗ tương S050235 (US2007180549); cây đỗ tương 5023230 (US2007180548); cây đỗ tương S050238 (US2007174930); cây đỗ tương 5830261 (US2007174928); cây đỗ tương S050226 (US7247772); cây đỗ tương 5806063 (US7247771); cây đỗ tương S050233 (US7244881); cây đỗ tương 5726085 (US7241939); cây đỗ tương MT000792 (US7238867); cây đỗ tương 5521161 (US7235718); cây đỗ tương WW109447 (US7235717); cây đỗ tương BA947474 (US7220898); cây đỗ tương 5939002 (US7217870); cây đỗ tương 5726175 (US7217869); cây đỗ tương 5432082 (US7217868); cây đỗ tương SG0850RR (US7211715); cây đỗ tương SG1750NRR (US7208658); cây đỗ tương MT017827 (US7208657); cây đỗ tương 4N2V74028 (US7205458); cây đỗ tương CL431203 (US7202400); cây đỗ tương 4N0S63222 (US7199288); cây đỗ tương 5520279 (US7196253); cây đỗ tương 5834401 (US7196252); cây đỗ tương 5621161 (US7196251); cây đỗ tương CL722114 (US7196250); cây đỗ tương 5741081 (US7193140); cây đỗ tương CL727422 (US7186895); cây đỗ tương 4N2V55022 (US7183468); cây đỗ tương 5083011 (US7173169); cây đỗ tương 5626085 (US7169976); cây đỗ tương S050051 (US7169974); cây đỗ tương 4506816

(US2006294626); cây đỗ tương WW152201 (US7132594); cây đỗ tương CL727636 (US7132593); cây đỗ tương M08851 (US7126047); cây đỗ tương 4324401 (US7105728); cây đỗ tương S050164 (US7105727); cây đỗ tương 4136015 (US2006195931); cây đỗ tương 3133014 (US2006195930); cây đỗ tương S040132 (US2006195929); cây đỗ tương 4328386 (US2006195928); cây đỗ tương 1339013 (US2006195927); cây đỗ tương 4423183 (US2006195925); cây đỗ tương S040131 (US2006195924); cây đỗ tương 4929388 (US2006195923); cây đỗ tương 4817034 (US2006195922); cây đỗ tương 4916816 (US7098385); cây đỗ tương 4713487 (US2006191032); cây đỗ tương 4348019 (US2006191031); cây đỗ tương S040122 (US2006191030); cây đỗ tương S040133 (US2006185031); cây đỗ tương CL821418 (US7091404); cây đỗ tương 4441080 (US7091403); cây đỗ tương 4805442 (US2006179509); cây đỗ tương 4921237 (US2006179508); cây đỗ tương 4417380 (US2006174369); cây đỗ tương 4405070 (US2006174368); cây đỗ tương 4417779 (US7084328); cây đỗ tương S040125 (US2006168678); cây đỗ tương 4909380 (US7081572); cây đỗ tương S050162 (US7081571); cây đỗ tương 6084016 (US7081570); cây đỗ tương S050163 (US7078600); cây đỗ tương S040135 (US7078598); cây đỗ tương S040117 (US7078597); cây đỗ tương M03393 (US7071391); cây đỗ tương 4145306 (US7064253); cây đỗ tương 900213 (US2006117405); cây đỗ tương 1000126 (US2006117404); cây đỗ tương 901023 (US2006117403); cây đỗ tương S040130 (US7053280); cây đỗ tương 4706198 (US7053279); cây đỗ tương S040118 (US7053278); cây đỗ tương S040119 (US7053277); cây đỗ tương S040123 (US7053276); cây đỗ tương 4442112 (US7049497); cây đỗ tương 917013 (US7045689); cây đỗ tương S040124 (US7045691); cây đỗ tương 4238491 (US7045690); cây đỗ tương S010136 (US7041882); cây đỗ tương 900613 (US7030297); cây đỗ tương 4337175 (US7030301); cây đỗ tương S040121 (US7030300); cây đỗ tương 4216033 (US7030299); cây đỗ tương S040128 (US7022901); cây đỗ tương S040120 (US7022900); cây đỗ tương S040127 (US7019199); cây đỗ tương S040134 (US7015378); cây đỗ tương S040129 (US7015377); cây đỗ tương 4513420 (US7005564); cây đỗ tương 943013 (US2006031958); cây đỗ tương S030136 (US2006021081); cây đỗ tương 927013 (US2006021080); cây đỗ tương 1000109 (US2006015962); cây đỗ tương 90046112 (US2006010530); cây đỗ tương 90897327 (US2006010529); cây đỗ tương 90362421

(US2006010528); cây đỗ tương 03022253 (US2006010527); cây đỗ tương 02022433 (US2006010526); cây đỗ tương 02022323 (US2006010525); cây đỗ tương 02912951 (US2006010524); cây đỗ tương 0102115 (US2006010523); cây đỗ tương 915034 (US2006010522); cây đỗ tương 0509255 (US2006010521); cây đỗ tương 4803070 (US6982368); cây đỗ tương 4704310 (US6979762); cây đỗ tương SJ919784 (US2005268362); cây đỗ tương CL615261 (US2005268361); đỗ tương mới (US2004199964); cây đỗ tương 0509214 (US2005210542); cây đỗ tương 70826751 (US2005193442); cây đỗ tương 0509243 (US2005193441); cây đỗ tương 0509246 (US2005193440); cây đỗ tương 0509253 (US2005193439); cây đỗ tương 0509247 (US2005193438); cây đỗ tương 0509252 (US2005193437); cây đỗ tương 0509241 (US2005193436); cây đỗ tương 0509249 (US6884927); cây đỗ tương 0509244 (US2005183158); cây đỗ tương 0509240 (US2005183157); cây đỗ tương 0509239 (US2005183156); cây đỗ tương 0509254 (US2005183155); cây đỗ tương 0509245 (US2005183154); cây đỗ tương 0509251 (US2005183153); cây đỗ tương 4283008 (US6888050); cây đỗ tương 2386009 (US2005183152); cây đỗ tương 3282002 (US6870080); cây đỗ tương 0509248 (US2005183151); cây đỗ tương 5091007 (US6906249 ()); cây đỗ tương 0509236 (US2005166281); cây đỗ tương 0509235 (US2005166280); cây đỗ tương 0509237 (US2005166279); cây đỗ tương SG5322NRR (US2005164390); cây đỗ tương SG5030NRR (US2005166278); cây đỗ tương SG4911NRR (US2005166277); cây đỗ tương S030153 (US2005160504); cây đỗ tương S030158 (US2005144680); cây đỗ tương S030160 (US2005144679); cây đỗ tương S030161 (US2005144678); cây đỗ tương S030157 (US2005144677); cây đỗ tương S030155 (US2005144676); cây đỗ tương S030156 (US2005144675); cây đỗ tương S030159 (US2005144674); cây đỗ tương S030154 (US6900376); cây đỗ tương S020030 (US2005114929); cây đỗ tương S030010 (US2005114928); cây đỗ tương SG1431RR (US2005097629); cây đỗ tương SG1330NRR (US2005097642); cây đỗ tương S030150 (US2005071900); cây đỗ tương S022209 (US2005050601); cây đỗ tương S022217 (US2005050600); cây đỗ tương S022219 (US2005050599); cây đỗ tương S030151 (US2005050598); cây đỗ tương 0491735 (US2005022272); cây đỗ tương SO22218 (US2005022271); cây đỗ tương 6190006 (US2004268447); cây đỗ tương SG1120RR (US2004250316); cây đỗ tương 0487681 (US2004237153); cây đỗ tương 0491717 (US2004237152); cây đỗ tương SO22220 (US2004237151); cây đỗ tương 0491715

(US2004237150); cây đỗ tương 0491712 (US2004237149); cây đỗ tương 0491718 (US2004237148); cây đỗ tương 99271316 (US2004221344); cây đỗ tương SO22212 (US2004221343); cây đỗ tương 0491737 (US2004221342); cây đỗ tương SO22211 (US2004221341); cây đỗ tương SO22210 (US2004221340); cây đỗ tương SO22213 (US2004221339); cây đỗ tương 0491725 (US2004221346); cây đỗ tương 03129016 (US2004221329); cây đỗ tương SO22208 (US2004221328); cây đỗ tương SO22207 (US2004221345); cây đỗ tương 02932 (US2004210968); cây đỗ tương 94137321 (US2004205862); cây đỗ tương 94106224 (US2004205861); cây đỗ tương 94143901 (US2004205859); cây đỗ tương 0487685 (US2004205858); cây đỗ tương 92440927 (US2004205857); cây đỗ tương 0487686 (US2004205856); cây đỗ tương SO22215 (US2004205855); cây đỗ tương SO22214 (US2004205854); cây đỗ tương 0491726 (US2004205849); cây đỗ tương 92478609 (US2004205853); cây đỗ tương 922013 (US6781040); cây đỗ tương 0491727 (US2004205852); cây đỗ tương 0491728 (US2004205851); cây đỗ tương 1465003 (US2004098766); cây đỗ tương 3186004 (US2004019936); cây đỗ tương 7085005 (US2004205850); cây đỗ tương SO22204 (US2004199958); cây đỗ tương SO22206 (US2004199957); cây đỗ tương 0491731 (US2004199956); cây đỗ tương 0491733 (US2004199955); cây đỗ tương 0491738 (US2004199954); cây đỗ tương 0491732 (US2004199953); cây đỗ tương 0491729 (US2004199952); cây đỗ tương SO20011 (US2004199951); cây đỗ tương 0491739 (US2004199950); cây đỗ tương 0491730 (US2004199949); cây đỗ tương 13873 (US2004199948); cây đỗ tương 954011 (US2004181822); cây đỗ tương 010022 (US2004181831); cây đỗ tương 4181001 (US2003229926); cây đỗ tương 0491721 (US2004168228); cây đỗ tương 0491723 (US6911581); cây đỗ tương 0491716 (US2004168226); cây đỗ tương 0491713 (US2004168225); cây đỗ tương 0491711 (US2004168224); cây đỗ tương 0491722 (US2004168223); cây đỗ tương 0491724 (US2004168222); cây đỗ tương 0491720 (US2004168221); cây đỗ tương 0487682 (US2004168220); cây đỗ tương 0491714 (US2004168219); cây đỗ tương 0491719 (US2004168218); cây đỗ tương DP 5634 RR (US2003177540); cây đỗ tương S56-D7 (US2004098765); cây đỗ tương 926877 (US2004064859); cây đỗ tương SE73753 (US2004055059); cây đỗ tương SN83594 (US2004055058); cây đỗ tương SE71112 (US2004055056); cây đỗ tương SE73090 (US2004055054); cây đỗ tương SN79526 (US2004055053); cây đỗ tương SW90702 (US2004055052); cây đỗ tương SN79525

(US2004055051); cây đỗ tương SE90345 (US2004055050); cây đỗ tương 0149928 (US2004055049); cây đỗ tương SN83780 (US2004055048); cây đỗ tương 0053840 (US2004055047); cây đỗ tương 924001 (US2004055046); cây đỗ tương 0004747 (US2004055057); cây đỗ tương 0037357 (US2004055045); cây đỗ tương SN83366 (US2004055044); cây đỗ tương SN76208 (US2004055043); cây đỗ tương 0037370 (US2004055042); cây đỗ tương SX95512 (US2004049821); cây đỗ tương 0096008 (US2004049820); cây đỗ tương SN83544 (US2004049819); cây đỗ tương 0088401 (US2004049818); cây đỗ tương SN64195 (US2004049817); cây đỗ tương 0034754 (US2004049816); cây đỗ tương SN71173 (US2004049815); cây đỗ tương SN83211 (US2004049814); cây đỗ tương 92422749 (US2004045058); cây đỗ tương 0120311 (US2004045057); cây đỗ tương S010344 (US2004003438); cây đỗ tương 70876922 (US2004003437); cây đỗ tương 924496 (US2004003436); cây đỗ tương 19705120 (US2003237116); cây đỗ tương 19704220 (US2003235914); cây đỗ tương 19704280 (US2003237115); cây đỗ tương 19704210 (US2003237114); cây đỗ tương S37-N4 (US2003237113); cây đỗ tương 19602310 (US2003233685); cây đỗ tương 19704120 (US2003233684); cây đỗ tương 19704230 (US2003233683); cây đỗ tương 1000126 (US2003233682); cây đỗ tương 93831526 (US2003221226); cây đỗ tương 0322581 (US2003221225); cây đỗ tương 0332149 (US2003213028); cây đỗ tương 0332144 (US2003213027); cây đỗ tương 924788 (US2003213026); cây đỗ tương 924861 (US2003213025); cây đỗ tương 928070 (US2003213024); cây đỗ tương S010354 (US2003213023); cây đỗ tương S010360 (US2003213022); cây đỗ tương S010361 (US2003213021); cây đỗ tương S010363 (US2003213020); cây đỗ tương S010364 (US2003213019); cây đỗ tương 0332148 (US2003208805); cây đỗ tương 0332147 (US2003208804); cây đỗ tương 0332146 (US2003208803); cây đỗ tương 0332135 (US2003208802); cây đỗ tương 1000144 (US2003208801); cây đỗ tương 0332143 (US2003208800); cây đỗ tương 0332145 (US2003208799); cây đỗ tương S010345 (US2003204884); cây đỗ tương 0332131 (US2003204883); cây đỗ tương 0332130 (US2003204882); cây đỗ tương 0332129 (US2003204881); cây đỗ tương 0332122 (US2003204880); cây đỗ tương S010350 (US2003204879); cây đỗ tương S010355 (US2003204878); cây đỗ tương 031766 (US2003204877); cây đỗ tương S010353 (US2003204876); cây đỗ tương 0322580 (US2003200579); cây đỗ tương 0322579 (US2003200578); cây đỗ tương S010347 (US2003200577); cây đỗ tương S010349

(US2003200576); cây đỗ tương 0332141 (US2003200575); cây đỗ tương 0332142 (US2003200574); cây đỗ tương 0332133 (US2003200573); cây đỗ tương 0332134 (US2003200572); cây đỗ tương 0332139 (US2003200571); cây đỗ tương 0332137 (US2003200570); giống đỗ tương XB33U08 (US7598435); giống đỗ tương XB27D08 (US7592519); giống đỗ tương XB41M08 (US7589261); giống đỗ tương XB05J08 (US7589260); giống đỗ tương XB33T08 (US7589259); giống đỗ tương XB30Y08 (US7586025); giống đỗ tương XB40U08 (US7582813); giống đỗ tương XB29M08 (US7582811); giống đỗ tương 93Y10 (US2009144843); giống đỗ tương D4325666 (US2009055957); giống đỗ tương D4125897 (US2009055956); giống đỗ tương D4698573 (US2009055955); giống đỗ tương D4356652 (US2009019592); giống đỗ tương D4456885 (US2009019591); giống đỗ tương D4698013 (US2009019590); giống đỗ tương D4637114 (US2009019589); giống đỗ tương D4102367 (US2009019595); giống đỗ tương D4266582 (US2009019594); giống đỗ tương D4422801 (US2009019593); giống đỗ tương D4520980 (US2009019588); giống đỗ tương D4521369 (US2009019587); giống đỗ tương D4223057 (US2009019586); giống đỗ tương D4682156 (US2009019585); giống đỗ tương D4233569 (US2009019584); giống đỗ tương D4925614 (US2009019583); giống đỗ tương D4203144 (US2009019604); giống đỗ tương D4102536 (US2009019582); giống đỗ tương D4865324 (US2009019581); giống đỗ tương D4825495 (US2009019580); giống đỗ tương D4659251 (US2009019579); giống đỗ tương D4258962 (US2009019578); giống đỗ tương D4253969 (US2009019577); giống đỗ tương D4696658 (US2009019603); giống đỗ tương D4256925 (US2009019576); giống đỗ tương D4253681 (US2009019575); giống đỗ tương D4789254 (US2009019574); giống đỗ tương D4713125 (US2009019573); giống đỗ tương D4526223 (US2009019572); giống đỗ tương D4556201 (US2009019571); giống đỗ tương D4012368 (US2009019570); giống đỗ tương D4452019 (US2009019569); giống đỗ tương D4201483 (US2009019568); giống đỗ tương D4463892 (US2009019567); giống đỗ tương D4159630 (US2009019566); giống đỗ tương D4470236 (US2009019565); giống đỗ tương D4063284 (US2009019564); giống đỗ tương D4021792 (US2009013429); giống đỗ tương D4902530 (US2009013428); giống đỗ tương D4367012 (US2009013427); giống đỗ tương D4923560 (US2009013426); giống đỗ tương D4253854 (US2009013425); giống đỗ tương D4210110 (US2009007290); giống đỗ tương D4523081 (US2009007289);

giống đỗ tương D4328762 (US2009007288); giống đỗ tương D4483789 (US2009007287); giống đỗ tương D4311702 (US2009007286); giống đỗ tương D4127789 (US2008313765); giống đỗ tương D4361423 (US2008313764); giống đỗ tương D4208814 (US2008313763); giống đỗ tương D4201139 (US2008313762); giống đỗ tương D4120384 (US2008313761); giống đỗ tương D4572906 (US2008313760); giống đỗ tương D4301279 (US2008313759); giống đỗ tương D4422957 (US2008313758); giống đỗ tương D4256958 (US2008313757); giống đỗ tương 4074328 (US2008282366); giống đỗ tương XB47Q06 (US2008244767); giống đỗ tương XB26R06 (US2008244766); giống đỗ tương 4991629 (US2008216190); giống đỗ tương 4158090 (US2008216189); giống đỗ tương XB40K07 (US2008209582); giống đỗ tương D0069201 (US2008178345); giống đỗ tương D0064801 (US2008178320); giống đỗ tương D0063801 (US2008178344); giống đỗ tương D0061501 (US2008178343); giống đỗ tương 4938051 (US2008178319); giống đỗ tương 4880500 (US2008178318); giống đỗ tương 4835953 (US2008178317); giống đỗ tương 4684181 (US2008178342); giống đỗ tương 4427363 (US2008178340); giống đỗ tương 4676311 (US2008178339); giống đỗ tương 4953710 (US2008178337); giống đỗ tương 4857548 (US2008178336); giống đỗ tương 4551757 (US2008178335); giống đỗ tương 4027271 (US2008178334); giống đỗ tương 4274171 (US2008178333); giống đỗ tương 0341931 (US2008178332); giống đỗ tương 4282159 (US2008178331); giống đỗ tương 4852004 (US2008178330); giống đỗ tương 4688589 (US2008178329); giống đỗ tương 4614131 (US2008178327); giống đỗ tương 4201823 (US2008178326); giống đỗ tương 92M22 (US2008178350); giống đỗ tương 4174206 (US2008178322); giống đỗ tương 4305498 (US2008178321); giống đỗ tương 4423586 (US2008172761); giống đỗ tương 4568207 (US2008172756); giống đỗ tương 4840308 (US2008172755); giống đỗ tương 4256323 (US2008172754); giống đỗ tương 4789516 (US7399907); giống đỗ tương 90Y40 (US2008168581); giống đỗ tương 4959932 (US7396983); giống đỗ tương 4062885 (US7394000); giống đỗ tương 4858197 (US7390940); giống đỗ tương 4092390 (US7390939); giống đỗ tương 4735486 (US7390938); giống đỗ tương 4219527 (US7388132); giống đỗ tương 4599695 (US7388131); giống đỗ tương 4554257 (US7388130); giống đỗ tương 4896902 (US7385113); giống đỗ tương 4367308 (US7385112); giống đỗ tương 4589609 (US7385111); giống đỗ tương 4640250 (US7385110); giống đỗ tương 4540394 (US7385109); giống đỗ tương 4297661 (US7385108); giống đỗ tương

4958786 (US7381866); giống đỗ tương 4440685 (US7375262); giống đỗ tương
 4008211 (US7371938); giống đỗ tương 4778469 (US7368637); giống đỗ tương
 4766295 (US7355103); giống đỗ tương 4436909 (US7355102); giống đỗ tương
 4812469 (US7351886); giống đỗ tương 4761767 (US7351885); giống đỗ tương
 4142393 (US7329801); giống đỗ tương 4502135 (US7326832); giống đỗ tương
 4353363 (US7321082); giống đỗ tương 91B42 (US7317143); giống đỗ tương 0330739
 (US2007271622); giống đỗ tương 0384279 (US7294768); giống đỗ tương 4175567
 (US2007256187); giống đỗ tương 4336643 (US2007256186); giống đỗ tương 4671685
 (US2007256185); giống đỗ tương 4309194 (US2007256190); giống đỗ tương 0330738
 (US2007256184); giống đỗ tương 0045477 (US2007256183); giống đỗ tương 0437973
 (US2007256182); giống đỗ tương 0457028 (US2007256181); giống đỗ tương 0367478
 (US2007256180); giống đỗ tương 0358232 (US2007256179); giống đỗ tương 0417158
 (US2007256178); giống đỗ tương 4559809 (US2007256177); giống đỗ tương 0196172
 (US2007256176); giống đỗ tương 4785923 (US2007256175); giống đỗ tương 4587513
 (US2007256174); giống đỗ tương 0409670 (US2007256173); giống đỗ tương 4010165
 (US2007256172); giống đỗ tương 0421133 (US2007256171); giống đỗ tương 0240187
 (US2007256170); giống đỗ tương 0387907 (US2007256169); giống đỗ tương 0232405
 (US2007256168); giống đỗ tương 0146529 (US2007256167); giống đỗ tương 4788561
 (US2007256166); giống đỗ tương 457114 (US2007256165); giống đỗ tương 0149217
 (US2007256164); giống đỗ tương 4247825 (US2007254366); giống đỗ tương 0212938
 (US2007256163); giống đỗ tương 0146565 (US2007256162); giống đỗ tương 4647672
 (US2007256161); giống đỗ tương 0215818 (US2007256160); giống đỗ tương 0384531
 (US2007256159); giống đỗ tương 4878185 (US2007254365); giống đỗ tương 4498438
 (US2007256158); giống đỗ tương 0436052 (US2007256157); giống đỗ tương 4782157
 (US2007256156); giống đỗ tương 0385457 (US2007256155); giống đỗ tương 0385240
 (US2007256154); giống đỗ tương 4735316 (US2007256153); giống đỗ tương 0277524
 (US2007256152); giống đỗ tương 0276951 (US2007256151); giống đỗ tương XB37L07
 (US2007245429); giống đỗ tương XB35X07 (US2007226837); giống đỗ tương
 XB35S07 (US2007226836); giống đỗ tương XB35F07 (US2007226835); giống đỗ
 tương XB34R07 (US2007226834); giống đỗ tương XB34L07 (US2007226833); giống
 đỗ tương XB34D07 (US2007226832); giống đỗ tương XB33G07 (US2007226831);
 giống đỗ tương 98Y11 (US2007169220); giống đỗ tương 0137335 (US7241941); giống

đỗ tương XB15E07 (US2007150980); giống đỗ tương 92M52 (US2007150979); giống
 đỗ tương XB47R07 (US2007136888); giống đỗ tương XB46V07 (US2007136887);
 giống đỗ tương XB57E07 (US2007136886); giống đỗ tương XB54X07
 (US2007136885); giống đỗ tương XB54V07 (US2007136884); giống đỗ tương
 XB52Q07 (US2007136883); giống đỗ tương XB37M07 (US2007136882); giống đỗ
 tương XB37J07 (US2007136881); giống đỗ tương XB34Q07 (US2007136880); giống
 đỗ tương XB32S07 (US2007136879); giống đỗ tương XB32J07 (US2007136878); giống
 đỗ tương XB31R07 (US2007136877); giống đỗ tương XB31J07 (US2007136876);
 giống đỗ tương XB29K07 (US2007136875); giống đỗ tương XB31H07
 (US2007136874); giống đỗ tương XB30G07 (US2007136873); giống đỗ tương
 XB30E07 (US2007136872); giống đỗ tương XB25E07 (US2007136871); giống đỗ
 tương XB26X07 (US2007136870); giống đỗ tương XB23L07 (US2007136869); giống
 đỗ tương XB19Z07 (US2007136868); giống đỗ tương XB19E07 (US2007136867);
 giống đỗ tương XB18M07 (US2007136866); giống đỗ tương XB18K07
 (US2007136865); giống đỗ tương XB18J07 (US2007136864); giống đỗ tương
 XB17W07 (US2007136863); giống đỗ tương XB17U07 (US2007136862); giống đỗ
 tương XB15B07 (US2007136861); giống đỗ tương XB12R07 (US2007136860); giống
 đỗ tương XB11J07 (US2007136859); giống đỗ tương XB04E07 (US2007136858);
 giống đỗ tương XB02K07 (US2007136857); giống đỗ tương XB49V07
 (US2007136856); giống đỗ tương XB48X07 (US2007136855); giống đỗ tương 92M75
 (US2007136854); giống đỗ tương XB48W07 (US2007136853); giống đỗ tương
 XB44G07 (US2007136852); giống đỗ tương XB42K07 (US2007136851); giống đỗ
 tương XB42H07 (US2007136850); giống đỗ tương XB41J07 (US2007136849); giống
 đỗ tương XB40Y07 (US2007136848); giống đỗ tương XB40X07 (US2007136847);
 giống đỗ tương XB39E07 (US2007136846); giống đỗ tương XB38W07
 (US2007136845); giống đỗ tương XB38S07 (US2007136844); giống đỗ tương
 XB23V07 (US2007136843); giống đỗ tương XB31M07 (US2007130652); giống đỗ
 tương XB28E07 (US2007130651); giống đỗ tương XB25S07 (US2007130650); giống
 đỗ tương XB21N07 (US2007130649); giống đỗ tương XB03Q07 (US2007130648);
 giống đỗ tương XB49Q07 (US2007130647); giống đỗ tương XB06M07
 (US2007130646); giống đỗ tương S04-97130-15-02 (US7196249); giống đỗ tương S04-
 97026-N99-42648-01 (US7189896); giống đỗ tương S05-97016-G99-21212

(US7186894); giống đỗ tương S05-99048-19 (US7164064); giống đỗ tương 92B14 (US7161065); giống đỗ tương 98R31 (US2007006350); giống đỗ tương S05-97177-N00-22972 (US7132592); giống đỗ tương XB25G06 (US2006225160); giống đỗ tương 91M70 (US2006174381); giống đỗ tương XB24R06 (US2006162029); giống đỗ tương S03-95368-N98-52902 (US7078594); giống đỗ tương S05-97130-51 (US7078599); giống đỗ tương XB11L06 (US2006130187); giống đỗ tương 94B13 (US7064251); giống đỗ tương 94B74 (US7064250); giống đỗ tương XB27J06 (US2006112462); giống đỗ tương XB29N06 (US2006112460); giống đỗ tương XB28T06 (US2006112459); giống đỗ tương XB16W06 (US2006112458); giống đỗ tương XB18C06 (US2006112456); giống đỗ tương XB10M06 (US2006107391); giống đỗ tương XB06K06 (US2006107390); giống đỗ tương XB28V06 (US2006107389); giống đỗ tương XB004A06 (US2006107388); giống đỗ tương XB12L06 (US2006107387); giống đỗ tương XB005A06 (US2006107386); giống đỗ tương XB25H06 (US2006107385); giống đỗ tương XB39W06 (US2006107384); giống đỗ tương XB27K06 (US2006107383); giống đỗ tương XB29R06 (US2006107382); giống đỗ tương XB16S06 (US2006107381); giống đỗ tương XB36V06 (US2006107380); giống đỗ tương XB07N06 (US2006107379); giống đỗ tương XB23H06 (US2006107378); giống đỗ tương XB35C06 (US2006107377); giống đỗ tương XB32L06 (US2006107376); giống đỗ tương XB58P06 (US2006107375); giống đỗ tương XB36M06 (US2006107374); giống đỗ tương XB22G06 (US2006107373); giống đỗ tương XB36Q06 (US2006107372); giống đỗ tương 91M61 (US2006107371); giống đỗ tương XB32A06 (US2006107370); giống đỗ tương XB19V06 (US2006107369); giống đỗ tương XB43C06 (US2006107368); giống đỗ tương XB22N06 (US2006107367); giống đỗ tương XB38E06 (US2006107366); giống đỗ tương XB37U06 (US2006107365); giống đỗ tương XB37Q06 (US2006107364); giống đỗ tương XB00D06 (US2006107363); giống đỗ tương XB14N06 (US2006107362); giống đỗ tương XB31H06 (US2006107361); giống đỗ tương XB21Z06 (US2006107360); giống đỗ tương XB005B06 (US2006107359); giống đỗ tương XB15W06 (US2006107358); giống đỗ tương XB33N06 (US2006107357); giống đỗ tương XB18W06 (US2006107356); giống đỗ tương XB32M06 (US2006107355); giống đỗ tương XB19F06 (US2006107354); giống đỗ tương S03-95021-55-138-AB (US7026531); giống đỗ tương 94M41 (US7002061); giống đỗ tương 91M50 (US6998518); giống đỗ tương 92B13

(US6989475); giống đỗ tương 93B68 (US6989474); giống đỗ tương 93B09 (US6979759); giống đỗ tương 92M00 (US6972352); giống đỗ tương XB08P05 (US2005120433); giống đỗ tương XB26V05 (US2005150023); giống đỗ tương XB21R05 (US2005108795); giống đỗ tương XB28E05 (US2005114942); giống đỗ tương XB58K05 (US2005114941); giống đỗ tương XB27B05 (US2005114940); giống đỗ tương XB21S05 (US2005150022); giống đỗ tương XB26U05 (US2005138695); giống đỗ tương XB35K05 (US2005150021); giống đỗ tương XB18S05 (US2005120436); giống đỗ tương XB25C05 (US2005120435); giống đỗ tương 90M01 (US2005120434); giống đỗ tương XB22H05 (US2005150020); giống đỗ tương XB22K05 (US2005114939); giống đỗ tương XB58G05 (US2005114938); giống đỗ tương XB57U05 (US2005120432); giống đỗ tương XB49M05 (US2005120431); giống đỗ tương XB20D05 (US2005144683); giống đỗ tương XB41B05 (US2005150019); giống đỗ tương XB38T05 (US2005120430); giống đỗ tương XB13T05 (US2005120429); giống đỗ tương XB19Y05 (US2005120428); giống đỗ tương XB43D05 (US2005120427); giống đỗ tương XB40E05 (US2005120426); giống đỗ tương XB39N05 (US2005120425); giống đỗ tương 93M01 (US2005120424); giống đỗ tương XB31W05 (US2005223439); giống đỗ tương XB32C05 (US2005114937); giống đỗ tương XB40D05 (US2005120423); giống đỗ tương 92M61 (US2005120422); giống đỗ tương 91M91 (US2005114936); giống đỗ tương XB33Y05 (US2005120421); giống đỗ tương XB34A05 (US2005120420); giống đỗ tương XB13U05 (US2005114935); giống đỗ tương XB12K05 (US2005114934); giống đỗ tương XB30P05 (US2005120419); giống đỗ tương XB57T05 (US2005114933); giống đỗ tương XB17S05 (US2005114932); giống đỗ tương XB25Y05 (US2005114930); giống đỗ tương XB25S05 (US2005150017); giống đỗ tương XB43W04 (US2004177420); giống đỗ tương XB44W04 (US2004177419); giống đỗ tương XB53J04 (US2004199960); giống đỗ tương XB43V04 (US2004216192); giống đỗ tương XB49K04 (US2004172668); giống đỗ tương XB27P04 (US2004205864); giống đỗ tương XB29L04 (US2004177418); giống đỗ tương XB29K04 (US2004177417); giống đỗ tương XB41U04 (US2004231017); giống đỗ tương XB34D04 (US2004177416); giống đỗ tương XB09J04 (US2004172711); giống đỗ tương XB32Y04 (US2004194169); giống đỗ tương XB44D04 (US2004172710); giống đỗ tương XB44C04 (US2004172709); giống đỗ tương XB10L04 (US2004172708); giống đỗ tương

XB19U04 (US2004172707); giống đỗ tương XB02F04 (US2004172706); giống đỗ tương XB25X04 (US2004172705); giống đỗ tương XB26L04 (US2004172704); giống đỗ tương XB11F04 (US2004172703); giống đỗ tương XB40Z04 (US2004177415); giống đỗ tương XB40Y04 (US2004181833); giống đỗ tương XB007C04 (US2004181832); giống đỗ tương 96M20 (US2004172702); giống đỗ tương XB39J04 (US2004172701); giống đỗ tương XB29A04 (US2004172700); giống đỗ tương XB35P04 (US2004172699); giống đỗ tương XB58Z04 (US2004177414); giống đỗ tương XB43R04 (US2004172698); giống đỗ tương XB35L04 (US2004172697); giống đỗ tương XB06H04 (US2004172696); giống đỗ tương XB59U04 (US2004172695); giống đỗ tương XB64C04 (US2004172694); giống đỗ tương 95M80 (US2004172693); giống đỗ tương XB35Q04 (US2004177413); giống đỗ tương XB04D04 (US2004177412); giống đỗ tương XB08L04 (US2004177411); giống đỗ tương XB18Q04 (US2004177410); giống đỗ tương XB16Q04 (US2004177409); giống đỗ tương XB55K04 (US2004172692); giống đỗ tương XB57M04 (US2004172691); giống đỗ tương XB25L04 (US2004205863); giống đỗ tương XB48T04 (US2004194168); giống đỗ tương XB42X04 (US2004199959); giống đỗ tương XB31T04 (US2004177408); giống đỗ tương XB31U04 (US2004194167); giống đỗ tương XB30E04 (US2004177407); giống đỗ tương XB31R04 (US2004177406); giống đỗ tương S03-95341-A98-60618 (US6909033); giống đỗ tương SN97-6946 (US2004168227); giống đỗ tương 94M70 (US6864408); giống đỗ tương 92M70 (US6797866); giống đỗ tương 92M71 (US6858782); giống đỗ tương 91M40 (US6828490); giống đỗ tương 93M80 (US6849789); giống đỗ tương XB39N03 (US6864407); giống đỗ tương 93M90 (US6846975); giống đỗ tương 90M90 (US6852913); giống đỗ tương 92M72 (US6960708); giống đỗ tương 91M90 (US6849788); giống đỗ tương 92M50 (US6855876); giống đỗ tương 92M30 (US6951974); giống đỗ tương 93M60 (US6797865); giống đỗ tương 93M40 (US6791016); giống đỗ tương 93M41 (US6835875); giống đỗ tương XB15P03 (US6797864); giống đỗ tương XB24H03 (US6936752); giống đỗ tương XB05A03 (US6815585); giống đỗ tương 92M80 (US6849787); giống đỗ tương XB33S03 (US6855875); giống đỗ tương XB48P03 (US6797863); giống đỗ tương XB29X03 (US6806406); giống đỗ tương XB02C03 (US6800795); giống đỗ tương XB29W03 (US6858781); giống đỗ tương 91M10 (US6958437); giống đỗ tương 92M10

(US6916975); giống đỗ tương XB10G03 (US6806405); giống đỗ tương 92M31 (US6846974); giống đỗ tương XB38D03 (US6806404); giống đỗ tương XB34N03 (US6803508); giống đỗ tương XB30W03 (US6809236); giống đỗ tương XB37J03 (US6844488); giống đỗ tương SE72581 (US2004148665); giống đỗ tương SE90076 (US2004148664); giống đỗ tương SD82997 (US2004148663); giống đỗ tương 0037393 (US2004148662); giống đỗ tương 0088414 (US2004148661); giống đỗ tương 0149926 (US2004148660); giống đỗ tương 0037209 (US2004148659); giống đỗ tương 93B36 (US6833498); giống đỗ tương 90B74 (US6812384); giống đỗ tương 90B51 (US6818809); giống đỗ tương 91B03 (US6815584); giống đỗ tương 95B43 (US6818808); giống đỗ tương 95B42 (US6815583); giống đỗ tương 92B47 (US6812383); giống đỗ tương SE90346 (US2004055055); giống đỗ tương 0007583 (US2004010824); giống đỗ tương 0008079 (US2004010823); giống đỗ tương S02-AP98041-2-333-01 (US2003121076); giống đỗ tương S02-98041-2-251-01 (US2003182694); giống đỗ tương S02-AP98041-2-262-02 (US2003196220); giống đỗ tương S02-95021-55-240-BA (US2003188348); giống đỗ tương APA94-31572 (US2003061641); giống đỗ tương AP98041-1-203 (US2003056251); giống đỗ tương APA95-15294 (US2003061640); giống đỗ tương AP98041-4-117 (US2003056250); giống đỗ tương 91B33 (US6580018); giống đỗ tương 93B85 (US6605762); giống đỗ tương 92B76 (US6610911); giống đỗ tương 92B38 (US6605761); giống đỗ tương 94B24 (US6613967); giống đỗ tương 94B73 (US6605760); giống đỗ tương 93B86 (US6610910); giống đỗ tương 91B12 (US6583343); giống đỗ tương 95B34 (US6605759); giống đỗ tương 94B23 (US6605758); giống đỗ tương 90B11 (US6583342); giống đỗ tương 91B92 (US6586659); giống đỗ tương 95B96 (US6605757); giống đỗ tương 93B72 (US6566589); giống đỗ tương 95B97 (US6613966); giống đỗ tương 92B95 (US6608243); giống đỗ tương 93B47 (US6583341); giống đỗ tương 97B52 (US6605756); giống đỗ tương 93B15 (US6617499); giống đỗ tương 94B54 (US6613965); giống đỗ tương 93B67 (US6573433); giống đỗ tương 93B87 (US6727410); giống đỗ tương 96B51 (US6613964); giống đỗ tương 92B84 (US6730829); giống đỗ tương 92B12 (US6605755); giống đỗ tương 90A07 (US6320105); giống đỗ tương 93B26 (US6342659); giống đỗ tương 96B21 (US6369301); giống đỗ tương 92B63 (US6326529); giống đỗ tương 93B46 (US6323402); giống đỗ tương 92B75

(US6362400); giống đỗ tương 93B08 (US6323401); giống đỗ tương 97B62 (US6323400); giống đỗ tương 92B37 (US6323399); giống đỗ tương 92B56 (US6339186); giống đỗ tương 93B66 (US6307131); giống đỗ tương 92B62 (US6346657); giống đỗ tương 92B36 (US6369300); giống đỗ tương 90B73 (US6316700); giống đỗ tương 95B95 (US6323398); giống đỗ tương 93B65 (US6229074); giống đỗ tương 92B24 (US6284950); giống đỗ tương 94B53 (US6235976); giống đỗ tương 94B22 (US6140557); giống đỗ tương 93B84 (US6143956); giống đỗ tương 95B32 (US6229073); giống đỗ tương 95B53 (US6147283); giống đỗ tương 93B35 (US6153816); giống đỗ tương 93B07 (US6143955); giống đỗ tương 92B74 (US6124526); giống đỗ tương 92B35 (US6166296); giống đỗ tương 94B45 (US6162968); giống đỗ tương 96B01 (US6143954); giống đỗ tương 93B53 (US6335197).

Quan sát thấy rằng quy trình nhập gen của các sự kiện ưu tú vào các cây trồng này không gây ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính kiểu hình hoặc đặc tính nông học mong đợi bất kỳ của các cây trồng này (không làm giảm sản lượng) trong khi sự biểu hiện của gen chuyển, như được xác định bởi khả năng chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol hoặc glufosinat, đạt được mức độ chấp nhận được về mặt thương mại.

Tốt hơn nữa nếu các cụm này có thể còn được kết hợp một cách thuận lợi với một hoặc nhiều sự kiện khác của đỗ tương có bán trên thị trường, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sự kiện chịu được thuốc diệt cỏ khác, như các sự kiện đã được mô tả trong các hồ sơ USDA-APHIS: 09-349-01p, 09-201-01p, 09-183-01p, 09-082-01p, 09-015-01p, 06-354-01p, 06-271-01p, 06-178-01p, 98-238-01p, 98-014-01p, 97-008-01p, 96-068-01p, 95-335-01p, 93-258-01p (ví dụ, xem www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html) hoặc sự kiện MON89788 (chịu được glyphosat) đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số 2006-282915, sự kiện DP-305423-1 (chịu được axit oleic/chất ức chế ALS ở mức độ cao) đã được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 2008/054747, MON87701 đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US2009130071, sự kiện 3560.4.3.5 đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US2009036308, hoặc sự kiện DP-305423-1 đã được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US2008312082, hoặc sự kiện BPS-CV127-9 (sự kiện 127) trong công bố đơn quốc tế số WO 2010/080829.

Như được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây, trừ khi rõ ràng được nêu khác đi, thuật ngữ "cây trồng" nhằm bao hàm cả mô của cây trồng, ở giai đoạn trưởng thành bất kỳ, cũng như tế bào, mô hoặc cơ quan bất kỳ lấy từ hoặc có nguồn gốc từ cây trồng bất kỳ như vậy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt, lá, phôi, hoa, rễ, tế bào đơn, giao tử, dịch nuôi cấy tế bào, dịch nuôi cấy mô hoặc thể nguyên sinh.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 được gửi lưu là 32-RRMM-0531 ở NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) ngày 12/10/2009, với số hiệu lưu giữ ở NCIMB là NCIMB 41659, và sức sống của nó đã được xác nhận. Tên gọi khác của EE-GM3 là sự kiện FG-072, hoặc MST-FGØ72-3.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM1 được gửi lưu là 32RRMM0368 ở NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) ngày 12/10/2009, với số hiệu lưu giữ ở NCIMB là NCIMB 41658. Tên gọi khác của EE-GM1 là LL27, A2704-12, hoặc ACS-GMØØ5-3.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM2 được gửi lưu là 32CON0688 ở NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) vào ngày 12/10/2009, với số hiệu lưu giữ ở NCIMB là NCIMB 41660. Tên gọi khác của EE-GM2 là LL55, A5547-127, hoặc ACS-GMØØ6-4.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM1 được gửi lưu là đồ tương 111606 tại Bộ sưu tập giống chuẩn Mỹ ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA) vào ngày 11/6/2010, với số hiệu lưu giữ ở ATCC là PTA-11041.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 được gửi lưu là đồ tương 05SHX2XEB tại ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209, USA) vào ngày 11/6/2010, với số hiệu lưu giữ ở ATCC là PTA-11042.

Phần mô tả sáng chế trên đây chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn phạm vi của nó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện các thay đổi hoặc biến đổi khác nhau đối với các phương án đã được mô tả. Các thay đổi hoặc

biến đổi này có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi ý tưởng hoặc phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây đỗ tương hoặc phần của cây này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện ưu tú EE-GM3, như được tìm thấy trong hạt quy chiếu đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41659, là locus di truyền chứa ADN lạ chứa gen mã hóa 2mEPSPS khảm và gen mã hóa HPPD PF W336 khảm, và trong đó sự kiện ưu tú EE-GM2, như được tìm thấy trong hạt quy chiếu đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660, là locus di truyền chứa ADN lạ chứa gen mã hóa phosphinothrixin axetyltransferaza khảm.
2. Hạt đỗ tương chứa sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện ưu tú EE-GM3, như được tìm thấy trong hạt quy chiếu đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41659, là locus di truyền chứa ADN lạ chứa gen mã hóa 2mEPSPS khảm và gen mã hóa HPPD PF W336 khảm, và trong đó sự kiện ưu tú EE-GM2, như được tìm thấy trong hạt quy chiếu đã được gửi lưu ở NCIMB với số hiệu lưu giữ NCIMB 41660, là locus di truyền chứa ADN lạ chứa gen mã hóa phosphinothrixin axetyltransferaza khảm.
3. Phương pháp sản xuất sản phẩm đỗ tương, trong đó phương pháp này bao gồm bước thu được hạt đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và sự kiện EE-GM2 theo điểm 2, và từ đó sản xuất ra sản phẩm đỗ tương như vậy.
4. Phương pháp xử lý cây đỗ tương để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng cây đỗ tương bao gồm bước xử lý cây đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 theo điểm 1, bằng lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ trên cơ sở isoxaflutol và/hoặc trên cơ sở glyphosat và/hoặc trên cơ sở glufosinat, trong đó các cây này chịu được (các) thuốc diệt cỏ này.
5. Quy trình xử lý hạt mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 theo điểm 2 khi được gieo trên cánh đồng bằng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD, như isoxaflutol, tùy ý sau đó là phun glyphosat và/hoặc glufosinat hoặc hỗn hợp của chất ức chế HPPD với glyphosat và/hoặc glufosinat trên ngọn của các cây này làm thuốc diệt cỏ sau nảy mầm, trong đó cỏ dại được phòng trừ.
6. Quy trình phòng trừ cỏ dại, trong đó quy trình này bao gồm bước xử lý cây đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 theo điểm 1 bằng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD, như isoxaflutol, trên ngọn của các cây này, được dùng cùng với, sau hoặc trước khi xử lý

bằng glyphosat và/hoặc glufosinat làm thuốc diệt cỏ sau nảy mầm trên ngọn của các cây này.

7. Phương pháp nhận dạng sự có mặt đồng thời của sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong mẫu sinh phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM3 bằng cặp đoạn mồi hoặc mẫu dò đặc hiệu thứ nhất mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' và ADN lạ kế tiếp nó trong EE-GM3, một trong số các đoạn mồi của cặp đoạn mồi thứ nhất này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, đoạn mồi còn lại của cặp đoạn mồi thứ nhất này nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 hoặc đoạn mồi còn lại của cặp đoạn mồi thứ nhất nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 188 đến nucleotit 7252 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, và trong đó mẫu dò thứ nhất này chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, hoặc phần bổ sung của nó, như trong đó mẫu dò thứ nhất này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự này và phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM2 bằng cặp đoạn mồi hoặc mẫu dò đặc hiệu thứ hai mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' và ADN lạ kế tiếp nó trong EE-GM2, một trong số các đoạn mồi của cặp đoạn mồi thứ hai này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit 311, và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880, đoạn mồi còn lại của

cặp đoạn mỗi thứ hai này nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM2 chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507 hoặc đoạn mỗi còn lại của cặp đoạn mỗi thứ hai nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM2 chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 hoặc phần bổ sung của nó, và trong đó mẫu dò đặc hiệu thứ hai này chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, hoặc phần bổ sung của nó, như trong đó mẫu dò thứ hai này chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 14 từ nucleotit 301 đến 322 hoặc với SEQ ID No. 15 từ nucleotit 497 đến 518, hoặc phần bổ sung của các trình tự này, trong đó các sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 này là như được xác định theo điểm 1.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại hai đoạn ADN có từ 50 đến 1000 cặp bazơ từ axit nucleic có mặt trong mẫu sinh phẩm bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza thứ nhất với cặp đoạn mỗi thứ nhất nêu trên, và sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza thứ hai với cặp đoạn mỗi thứ hai nêu trên, nhờ đó phản ứng chuỗi polymeraza thứ nhất và thứ hai này có thể diễn ra theo cách tuần tự hoặc đồng thời.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 ở đầu tận cùng 3' của nó hoặc đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408 ở đầu tận cùng 3' của nó, và đoạn mỗi nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM3 chứa ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 188 đến nucleotit 7252 hoặc phần bổ sung của nó ở đầu 3' của nó, và trong đó đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của EE-GM2 chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit

311 ở đầu tận cùng 3' của nó hoặc đoạn môi nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM2 chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880 ở đầu tận cùng 3' của nó, và đoạn môi nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM2 chứa ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 hoặc phần bổ sung của nó ở đầu 3' của nó, như trong đó các đoạn môi đặc hiệu EE-GM3 này chứa trình tự của SEQ ID No. 5 và SEQ ID No. 4, một cách tương ứng, hoặc trình tự của SEQ ID No. 7 và SEQ ID No. 5 một cách tương ứng, và các đoạn môi đặc hiệu EE-GM2 này chứa trình tự của SEQ ID No. 18 và SEQ ID No. 19, một cách tương ứng.

10. Bộ kit để nhận dạng sự có mặt đồng thời của sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 trong mẫu sinh phẩm, trong đó bộ kit này chứa đoạn môi thứ nhất nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn môi thứ hai nhận dạng trình tự trong ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, ADN lạ này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 188 đến nucleotit 7252 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, và trong đó bộ kit này còn chứa đoạn môi thứ ba nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit 311, và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880, và đoạn môi thứ tư nhận dạng trình tự trong ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2, ADN lạ này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 hoặc phần bổ sung của nó.

11. Hai cặp đoạn mỗi thích hợp để sử dụng ở bước phát hiện đặc hiệu EE-GM3 và EE-GM2, trong đó cặp đoạn mỗi thứ nhất chứa đoạn mỗi thứ nhất chứa trình tự nhận dạng trình tự trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408 và đoạn mỗi thứ hai chứa trình tự nhận dạng trình tự trong các trình tự ADN lạ kế tiếp với vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' trong EE-GM3, ADN lạ kế tiếp với vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 và ADN lạ kế tiếp với vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240; và cặp đoạn mỗi thứ hai chứa đoạn mỗi thứ ba chứa trình tự nhận dạng trình tự trong vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit 311 và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880, và đoạn mỗi thứ tư chứa trình tự nhận dạng trình tự trong các trình tự ADN lạ kế tiếp với vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của EE-GM2, ADN lạ này kế tiếp với vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' chứa phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 và ADN lạ kế tiếp với vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507.

12. Cặp đoạn mỗi theo điểm 11, trong đó đoạn mỗi thứ nhất nêu trên chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408 ở đầu tận cùng 3' của nó, trong đó đoạn mỗi thứ hai nêu trên chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 ở đầu tận cùng 3' của nó, trong đó đoạn mỗi thứ ba nêu trên chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình

tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit 311 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880 ở đầu tận cùng 3' của nó, và trong đó đoạn mỗi thứ tư nêu trên chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên tiếp được chọn từ phần bổ sung của trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507 ở đầu tận cùng 3' của nó.

13. Bộ chứa bốn đoạn môi:

đoạn môi thứ nhất chứa trình tự của SEQ ID No. 5 ở đầu tận cùng 3' của nó;

đoạn môi thứ hai chứa trình tự của SEQ ID No. 4 ở đầu tận cùng 3' của nó;

đoạn môi thứ ba chứa trình tự của SEQ ID No. 18 ở đầu tận cùng 3' của nó; và

đoạn môi thứ tư chứa trình tự của SEQ ID No. 19 ở đầu tận cùng 3' của nó.

14. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai axit nucleic của mẫu sinh phẩm với mẫu dò đặc hiệu thứ nhất đối với EE-GM3 và với mẫu dò đặc hiệu thứ hai đối với EE-GM2, trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ nhất này có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM3 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó và trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ hai này có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của EE-GM2 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, như trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ nhất này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 hoặc với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự này và trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ hai này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 14 từ nucleotit 301 đến 322 hoặc với SEQ ID No. 15 từ nucleotit 497 đến 518, hoặc phần bổ sung của các trình tự này.

15. Bộ kit để nhận dạng sự có mặt đồng thời của sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 trong các mẫu sinh phẩm, trong đó bộ kit này chứa mẫu dò đặc hiệu thứ nhất, có khả năng lai một cách đặc hiệu với vùng đặc hiệu của EE-GM3 và mẫu dò đặc hiệu thứ hai có khả năng lai một cách đặc hiệu với vùng đặc hiệu của EE-GM2, trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ nhất này có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu

tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó và trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ hai này có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, như trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ nhất này chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự này và trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu thứ hai này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 14 từ nucleotit 301 đến 322 hoặc với SEQ ID No. 15 từ nucleotit 497 đến 518, hoặc phần bổ sung của các trình tự này.

16. Cặp mẫu dò đặc hiệu để nhận dạng sự có mặt đồng thời của sự kiện ưu tú EE-GM3 và sự kiện ưu tú EE-GM2 trong mẫu sinh phẩm, trong đó sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 này là như được xác định theo điểm 1, và trong đó cặp mẫu dò đặc hiệu này chứa mẫu dò thứ nhất chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, hoặc phần bổ sung của nó, và mẫu dò thứ hai chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, hoặc phần bổ sung của nó, như trong đó mẫu dò thứ nhất này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự này và trong đó mẫu dò thứ hai này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 14 từ nucleotit 301 đến 322 hoặc với SEQ ID No. 15 từ nucleotit 497 đến 518, hoặc phần bổ sung của các trình tự này.

17. Phương pháp xác nhận độ tinh khiết của hạt, hoặc sàng lọc hạt theo sự có mặt của sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM3 bằng cặp đoạn mồi hoặc mẫu dò đặc hiệu thứ nhất mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' và ADN lạ kế tiếp nó trong EE-GM3, một trong số các đoạn mồi của cặp đoạn mồi thứ nhất nhận

dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, đoạn môi còn lại của cặp đoạn môi thứ nhất nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 hoặc đoạn môi còn lại của cặp đoạn môi thứ nhất nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 1 từ nucleotit 188 đến nucleotit 7252 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 20 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, và trong đó mẫu dò thứ nhất này chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, hoặc phần bổ sung của nó, như trong đó mẫu dò thứ nhất này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc với SEQ ID No. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự này, và phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM2 bằng cặp đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu thứ hai mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' và ADN lạ kế tiếp nó trong EE-GM2, một trong số các đoạn môi của cặp đoạn môi thứ hai này nhận dạng vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2, vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' này chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 1 đến nucleotit 311, và vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3' này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 1880, đoạn môi còn lại của cặp đoạn môi thứ hai này nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM2 chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 810 hoặc trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 1 đến nucleotit 507 hoặc đoạn môi còn lại của cặp đoạn môi thứ hai nhận dạng trình tự trong ADN lạ của EE-GM2 chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 11 hoặc phần bổ sung của nó, và trong đó mẫu dò đặc hiệu thứ hai này chứa trình tự nucleotit có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn ở đầu tận cùng

5' hoặc trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM2 và trình tự của ADN lạ kế tiếp nó, hoặc phần bổ sung của nó, như trong đó mẫu dò thứ hai này chứa trình tự nucleotit mà có mức đồng nhất trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID No. 14 từ nucleotit 301 đến 322 hoặc với SEQ ID No. 15 từ nucleotit 497 đến 518, hoặc phần bổ sung của các trình tự này, trong các mẫu hạt, trong đó sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 này là như được xác định theo điểm 1.

18. Phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ưu tú EE-GM3 và EE-GM2 trong mẫu sinh phẩm bằng cách lai với mẫu dò axit nucleic đã được đánh dấu, gần như bổ sung, trong đó tỷ lệ mẫu dò:axit nucleic đích được khuếch đại bằng cách quay vòng trình tự axit nucleic đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) lai trình tự axit nucleic đích nêu trên với oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1469 hoặc phần bổ sung của nó hoặc oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 223 đến nucleotit 240 hoặc phần bổ sung của nó;

b) lai trình tự axit nucleic đích nêu trên với oligonucleotit của axit nucleic thứ hai chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 2 từ nucleotit 1434 đến nucleotit 1451 hoặc phần bổ sung của nó hoặc oligonucleotit của axit nucleic thứ hai chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 258 hoặc phần bổ sung của nó, trong đó oligonucleotit thứ nhất và thứ hai này trùng nhau ít nhất một nucleotit và trong đó oligonucleotit thứ nhất hoặc oligonucleotit thứ hai này được đánh dấu để làm mẫu dò axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên;

c) chỉ phân cắt mẫu dò đã được đánh dấu trong bộ đôi mẫu dò: trình tự axit nucleic đích bằng enzym gây phân cắt mẫu dò chọn lọc khiến phân ly bộ đôi, để trình tự đích còn nguyên vẹn;

d) quay vòng trình tự axit nucleic đích bằng cách lặp lại các bước (a) đến (c); và

e) phát hiện mẫu dò đã được đánh dấu và phân cắt, bằng cách đó xác định sự có mặt của trình tự axit nucleic đích nêu trên, và

f) lai trình tự axit nucleic đích nêu trên với oligonucleotit của axit nucleic thứ ba chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 312 đến nucleotit 329 hoặc phần bổ

sung của nó hoặc oligonucleotit của axit nucleic thứ ba chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 490 đến nucleotit 507 hoặc phần bổ sung của nó;

g) lai trình tự axit nucleic đích nêu trên với oligonucleotit của axit nucleic thứ tư chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 14 từ nucleotit 294 đến nucleotit 311 hoặc phần bổ sung của nó hoặc oligonucleotit của axit nucleic thứ tư chứa trình tự nucleotit của SEQ ID No. 15 từ nucleotit 508 đến nucleotit 525 hoặc phần bổ sung của nó, trong đó oligonucleotit thứ ba và thứ tư này trùng nhau ít nhất một nucleotit và trong đó oligonucleotit thứ ba hoặc oligonucleotit thứ tư này được đánh dấu để làm mẫu dò axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên;

h) chỉ phân cắt mẫu dò đã được đánh dấu trong bộ đôi mẫu dò: trình tự axit nucleic đích bằng enzym gây phân cắt mẫu dò chọn lọc khiến phân ly bộ đôi, để trình tự đích còn nguyên vẹn;

i) quay vòng trình tự axit nucleic đích bằng cách lặp lại các bước từ (f) đến (h); và

j) phát hiện mẫu dò đã được đánh dấu và phân cắt, bằng cách đó xác định sự có mặt của trình tự axit nucleic đích nêu trên.

19. Sản phẩm đồ tương được sản xuất từ hạt mang EE-GM3 và EE-GM2 theo điểm 2, trong đó sản phẩm đồ tương này là hoặc bao gồm bột đồ tương xay thô, hạt nghiền, bột, hoặc vảy, và chứa axit nucleic đặc hiệu đối với sự kiện ưu tú EE-GM2 và EE-GM3, như có thể phát hiện được bằng cách sử dụng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 7 đến 9 hoặc điểm 14.

EE-GM3

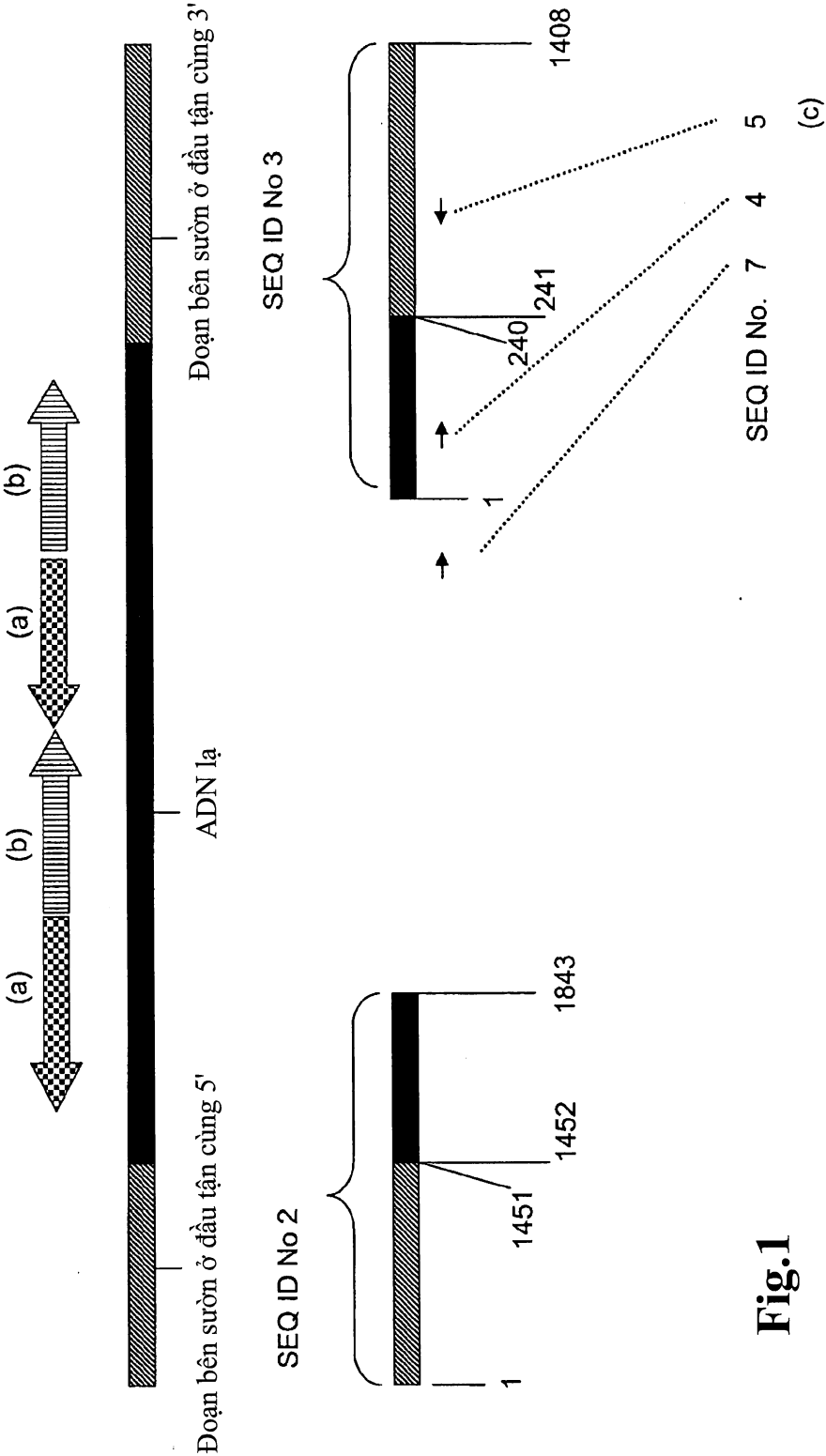


Fig.1



EE-GM1

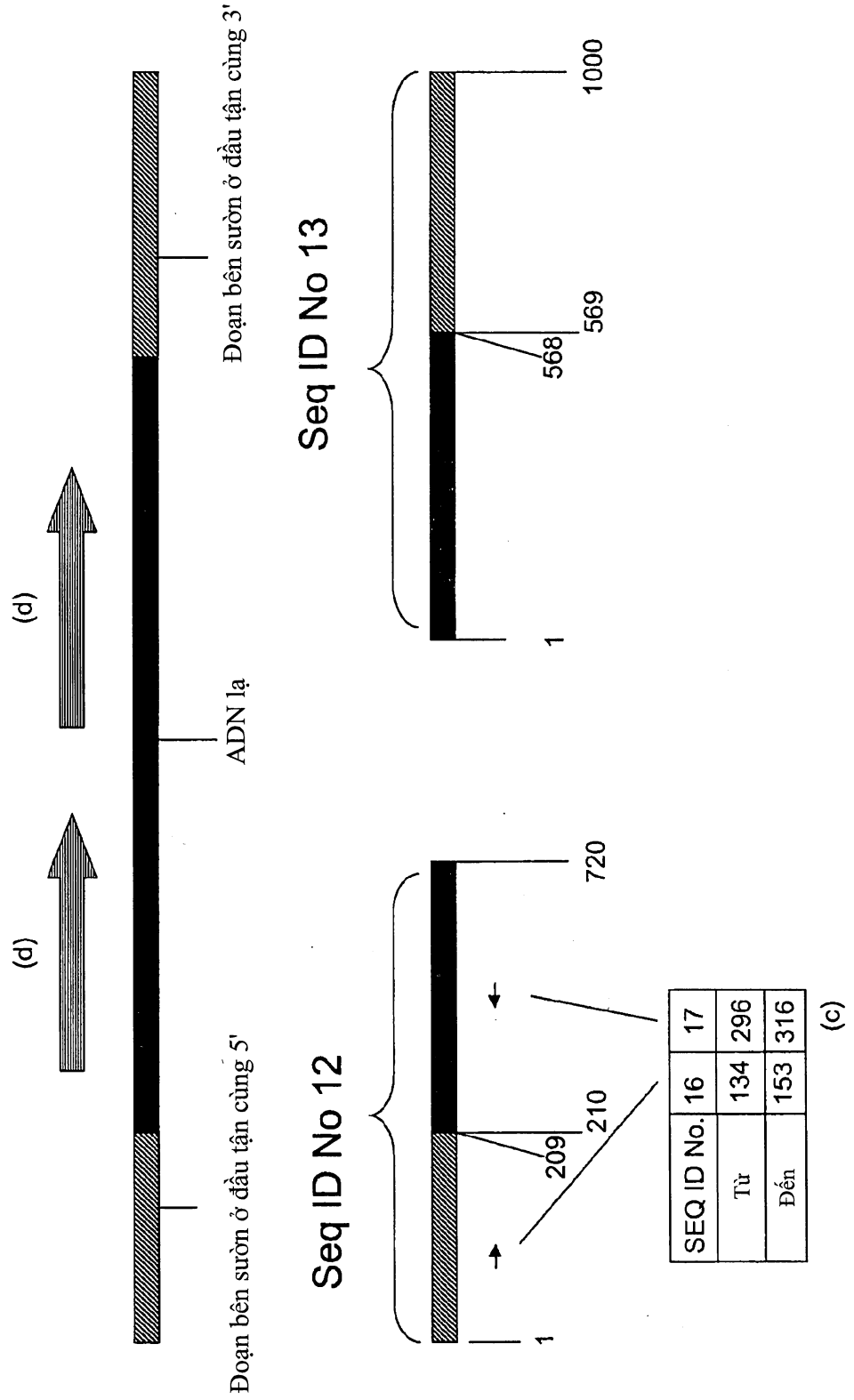


Fig.3

EE-GM2

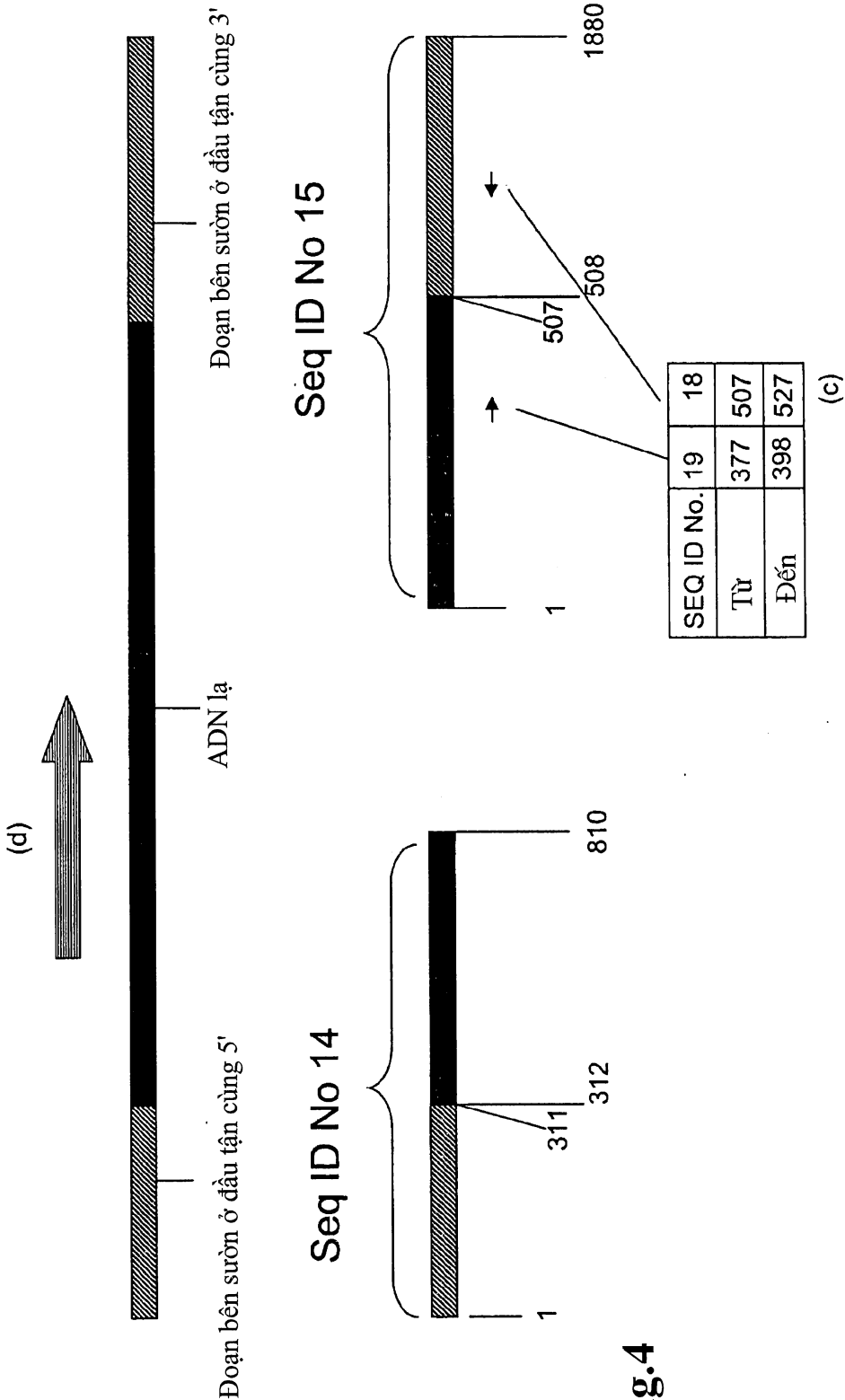
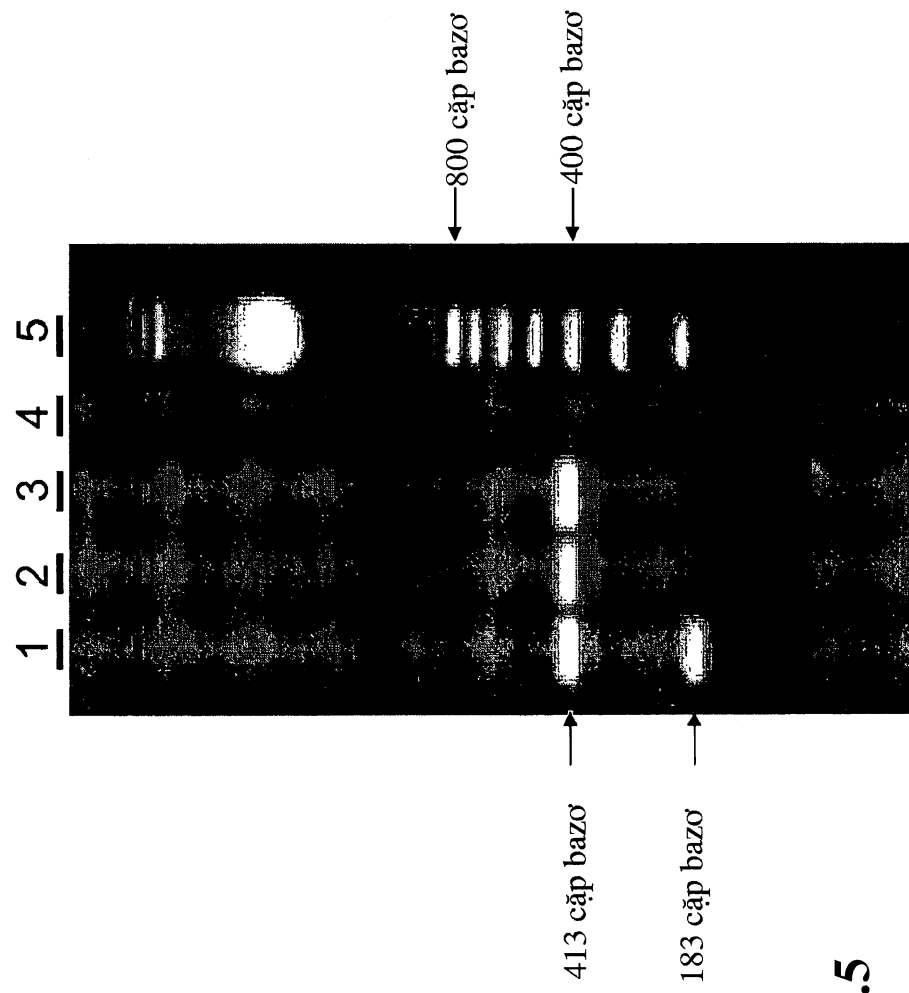
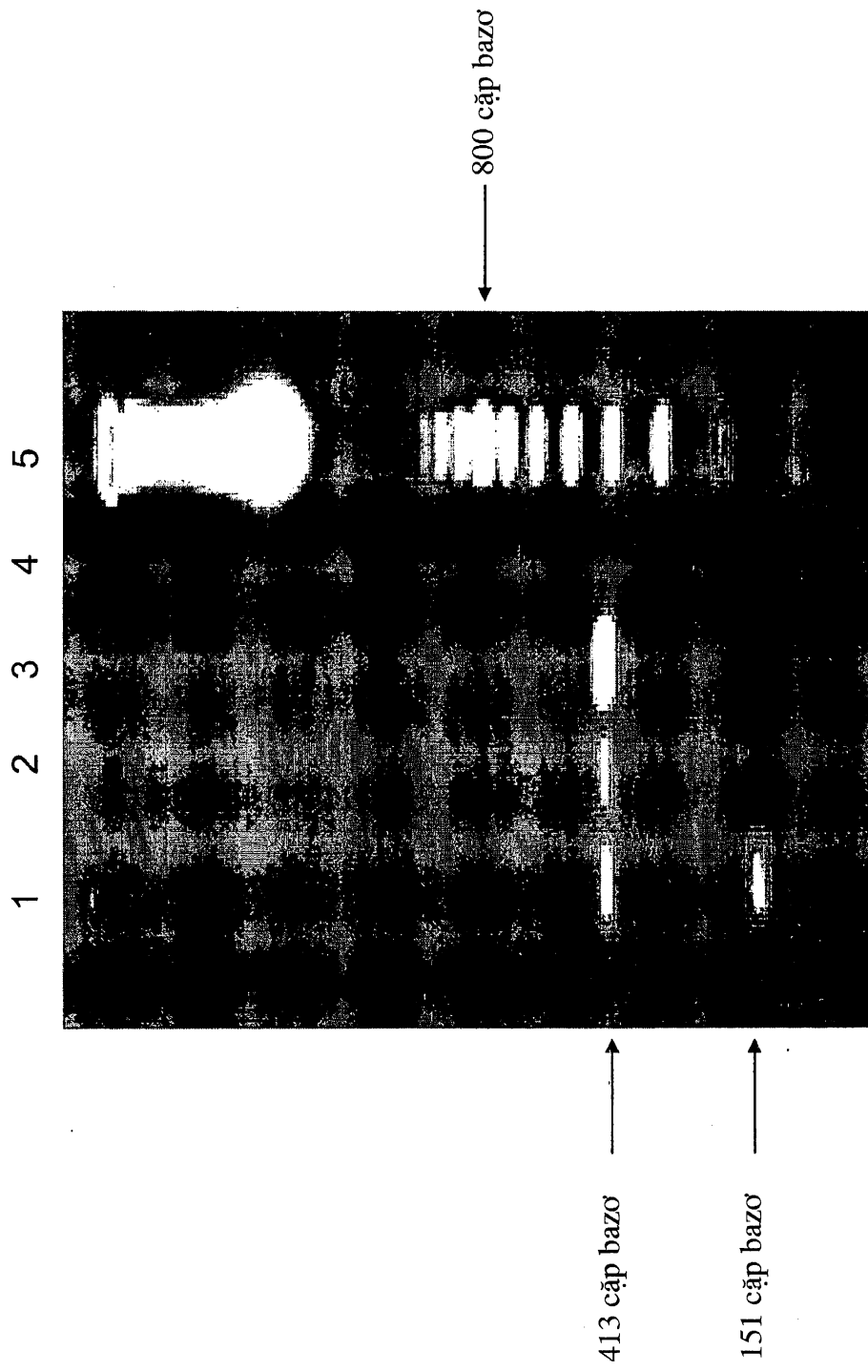


Fig.4

**Fig.5**

**Fig.6**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Bayer BioScience N.V.
M.S Technologies LLP
MASON Justin Thomas
LETTOW Leslie James
EBY Mark Alan
EBY William H.
WELZ Gunter
VERHAEGHE Steven
DE BEUCKELEER Marc
HABEX Veerle
FERRULO Jean-Marc
- <120> Cây đỗ tương mang sự kiện EE-GM3 và EE-GM2 chịu được thuốc diệt cỏ và phương pháp nhận dạng sự có mặt đồng thời của sự kiện này trong mẫu sinh phẩm
- <130> BCS 09-2010
- <140> tba
<141> 2010-11-23
- <150> 09014565.7
<151> 2009-11-23
- <150> 61/263,707
<151> 2009-11-23
- <150> 61/367,251
<151> 2010-07-23
- <160> 22
- <170> PatentIn phiên bản 3.3
- <210> 1
<211> 7296
<212> ADN
<213> Nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn SalI của vector pSF10
- <220>
<221> gen kết thúc
<222> (188) .. (479)
<223> 3' nos: trình tự bao gồm cả vùng không dịch mã ở đầu tận cùng 3' của gen nopalín synthaza từ ADN T của pTiT37 của *Agrobacterium tumefaciens* - bổ sung
- <220>
<221> Đặc điểm hỗn tạp
<222> (480) .. (1556)
<223> hppdPF W336: trình tự ghi mã 4-hydrophenylpyruvat dioxygenaza của chủng *Pseudomonas fluorescens* A32 đã được biến đổi bằng cách thay thế axit amin Glyxin 336 bằng Tryptophan - bổ sung
- <220>
<221> peptit chuyển tiếp
<222> (1557) .. (1928)
<223> TRotp Y: trình tự ghi mã peptit chuyển tiếp đã được tối ưu hóa

dẫn xuất (vị trí 55 thay đổi thành Tyrosin), chứa trình tự của gen siêu phân tử nhỏ RuBisCO của *Zea mays* (ngô) và *Helianthus annuus* (hướng dương) - bổ sung

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1929) .. (2069)

<223> 5'tev: trình tự bao gồm trình tự dẫn đầu của virus gây bệnh khảm ở thuốc lá - bổ sung

<220>

<221> gen khởi đầu

<222> (2070) .. (3359)

<223> ph4a748 ABBC: trình tự bao gồm vùng gen khởi đầu của gen H4 histon của *Arabidopsis thaliana*, chứa sao chép nội tại-bổ sung

<220>

<221> gen khởi đầu

<222> (3360) .. (4374)

<223> Ph4a748: trình tự bao gồm vùng gen khởi đầu của gen histon H4 của *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> Intron

<222> (4375) .. (4855)

<223> Intron1 h3At: intron thứ nhất của gen II của biến thể histon H3.III của *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> peptit chuyển tiếp

<222> (4856) .. (5227)

<223> TPotp C: trình tự ghi mã peptit chuyển tiếp đã được tối ưu hóa, chứa trình tự của gen siêu phân tử nhỏ RuBisCO của *Zea mays* (ngô) và *Helianthus annuus* (hướng dương)

<220>

<221> , đặc điểm hỗn tạp

<222> (5228) .. (6565)

<223> 2mepsps: trình tự ghi mã gen 5-enol-pyruvylshikimat-3-phosphat synthaza đột biến kép của *Zea mays* (ngô) (Lebrun et al., 1997)

<220>

<221> gen kết thúc

<222> (6566) .. (7252)

<223> 3'histonAt: trình tự bao gồm vùng không dịch mã ở đầu tận cùng 3' của gen histon H4 của *Arabidopsis thaliana* (Chabouté et al., 1987)

<400> 1

gtcgactcta gcagatctgg ccggcccacc ggtgggcat atggggccgc ggccgcgaat 60

tcgagctcgg tacctacctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 120

cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg cggccgcaat 180

tcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt taccctagtt tgcgcgctat 240

atattgtttt ctatcgcgta ttaaattgtat aattgcggga ctctaatacat aaaaacccat 300

ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacat gcttaacgta attcaacaga 360

aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca atcttaagaa actttattgc 420

caaagtgttg aacgatcggg gaaattcgtc gagtcaccct cggccgggct ttttgacgct	480
taatcggcgg tcaatacacc acgacgcacc tggtcacgtt cgatggactc gaacagcgcc	540
ttgaagttcc actcgccaaa cccatcgtcg cccttgcgct ggatgaattc gaagaacacc	600
gggcccacatca gggtttccga gaagatctgc agcagcaggc gtttgtcgcc ttccacggaa	660
gatccgtcca gcaggatacc gcgtgcctgc agttgatcca ccggctcgcc gtggtcaggc	720
aggcggcctt cgagcatttc gtaataagtg tctggcggcg cggtcatgaa gcgcatgccg	780
atcttcttca acgcgtccca ggtcttgacc aggtcgtcgg tgaggaaacgc cacgtgctgg	840
atgccttcgc cgttgaaactg catcaggaac tcttcgatct gccccgcgcc cttggacgac	900
tcttcgttca gcgggatgcg gatcatgccg tccggcgcac tcatggcctt ggaagtcagg	960
ccggtgtact cgcccttgat atcgaagtaa cgcgcttcac ggaagttgaa caatttctcg	1020
tagaagttgg cccagtagac catgcggccg cgatagacgt tgtgggtcag gtggtcgatg	1080
actttgagac ctgcaccgac cggattgcmc tccacacctt cgaggtagac gaagtcgatg	1140
tcgtagatcg agctgccttc gccgaaacgg tcgatcaggt acaacggcgc gccgccgatg	1200
cccttgatcg ccggcagggt caattccatc ggcccgggtg caatatggat cggctgggcg	1260
ccgagttcca gggcgcgggt gtaggcctt tgcgagtcct tcacgcggaa cgccatgccg	1320
cacaccgacg ggccgtgttc ggccgcaaag taggaggcga tgctgttggg ctggtgttg	1380
aggatcaggt tgatctcgcc ctggcgggtac aggtgcacgt tcttggaacg gtgggtcgcg	1440
actttggtga agcccatgat ctcgaagatc ggctccaggg taccggcgct cggcgacgcg	1500
aattcgatga attcaaagcc catcaggccc attgggtttt cgtatagatc tgccatgcac	1560
cggatccttc cgccgttgct gacgttgccg aggttcttg aggagcggcg ggcgacgggg	1620
aggctggcgg tggacttgag cccctggaac ggagcgacgg cggtagccga cgaggccatc	1680
atcacggtgg gcgccataga cagcggcggc aggtacgaca gcgtctcgaa cttcttggtg	1740
ccgtaggccg gccacacctg catatattga actcttcac cgttgctggg aagggtggag	1800
aagtcgttag ctttcttggt ggtggggaag gcggcggttg acttaaggcc ggtgaacgga	1860
gccaccatgt tggcctgagc aggggcggtc cggctaacgg tcgcgactga ggaggagatc	1920
gaagccatgg ctatcgttcg taaatggtga aaattttcag aaaattgctt ttgctttaa	1980
agaaatgatt taaattgctg caatagaagt agaatgcttg attgcttgag attcgtttgt	2040
tttgatatatg ttgtgtttcg aattctagag tcgagagaaa ttgatgtctg tagaagaaga	2100
agaacggtta agagtagatt tgggtgagaa agatgtgaaa ttgtttttat aggcaaagac	2160
ggagagtcta ttttttgagc aatcagatcg catattaaat ctaacggctg agatatcgat	2220
ccgtgtgtac aataaaatga tgtataaacc gtcgatctgt tttaatcgac ggttcatatt	2280

```

agtgatccgc gtgatggcag tgatagccac taagaatcgt cttttgtttt acatgtggcg 2340
ccacaaatta gggtaatgaa gcggcaatat tttggaactc ggaaaataaa attgcgccat 2400
cacattattht gaaaattttc acatgctttt atthtataaaa cccacgaatt acaagttaca 2460
accgaaaaag atthtataata tagtgattta tactaatttt gtagtagctt aatgtatat 2520
gatactggaa aaacaatgac aatcatacga tccgtgtgta caataaaatg atgtataaac 2580
cgtcgatctg tthttaatcga cggttcatat tagtgatccg cgtgatggca gtgatagcca 2640
ctaagaatcg tctthtgttt tacatgtggc gccacaaatt agggtaatga agcggcaata 2700
thtthtggact cggaaaataa aattgcgcca tcacattatt tgaaaatttt cacatgcttht 2760
taththtataa acccacgaat tacaagttac aaccgaaaaa gattthtataat atagtgtatt 2820
atactaattt tgtagtagct taatgtatat tgatactgga aaaacaatga caatcatatg 2880
ttagtattat caagttatcg tattgatatt gatattggaa catacaatgg gtattgcctt 2940
ctthtcgacca taaatatcac caaattthaca aagthtgtgt ataccaagtt atcaattgta 3000
aatgggatgt caacatttht atthtcccttht gagaaactat agaccacaag aacacacttc 3060
aatagataaa gtaactattht acataagagg thtthttaaact acattaaaca aaataattac 3120
caaccggcac tcacaaatac aaacagagca cacgacatgt caaagccaca agtaaattcg 3180
ttgagtgggtg gthtthtattac aattgtgtca cthtgcagcac aaactatctt gctctgggaa 3240
tcattctcagc atcaaagatc atgctcactt caggggaact tagtgtatcc atgcctcgac 3300
tcataththtct cctcgacctg caggcatgca agctctagag cggccggcac cgcggtggag 3360
gtactcgagt cgcgacgtac gthtgaacaa thtggthttht aaagcttgcat gcctgcaggt 3420
cgaggagaaa tatgagtcga ggcattggata cactaagtht ccctgaagtg agcatgatct 3480
thtgatgctga gatgattccc agagcaagat agthtgtgct gcaagtgaca caattgtaat 3540
gaaaccacca ctcaacgaat thtactgtgg cthtgacatg tcgtgtgctc thtthtgtatt 3600
tgtgagtgcc ggttggtaat thtththtgtt aatgtgattt taaaacctct tatgtaaata 3660
gttactthtct ctattgaagt gtgtthtctgt ggtctatagt thtctcaaagg gaaattaaaa 3720
gtthtgacatc ccattthaca thtgataactt ggtatacaca aactthtgta atthtggatg 3780
atthtatggtc gaaagaaggc aataccatt gtatgtthtca atatcaatat caatacgata 3840
acttgataat actaacatat gattgtcatt gththtthtccag tatcaatata cattaagcta 3900
ctacaaaatt agtataaatc actatattat aaactththt cggthtgtaac thtgtaattcg 3960
tgggtththt aaataaaagc atgtgaaaat thtcaaataa thtgatggcg caaththtatt 4020
thtccgagtht caaaatattg ccgthttht accctaattt gtggcgccac atgtaaaaca 4080
aaagacgatt cttagtggct atcactgcca tcacgcggat cactaatatg aaccgtcgat 4140
taaaacagat cgacggttht tacatcattt thtthgtacac acggatcgat atctcagccg 4200

```


ttagatttaa	tatgcatct	gattgctcaa	aaaatagact	ctccgtcttt	gcctataaaa	4260
acaatttcac	atctttctca	cccaaatacta	ctcttaaccg	ttcttcttct	tctacagaca	4320
tcaatttctc	tcgactctag	aggatccaag	cttatcgatt	tcgaaccct	caggcgaaga	4380
acaggatatga	tttgtttgta	attagatcag	gggttttaggt	ctttccatta	ctttttaatg	4440
ttttttctgt	tactgtctcc	gcatctgat	tttacgacaa	tagagtctcg	ggttttgtcc	4500
cattccagtt	tgaaaataaa	ggtccgtctt	ttaagtttgc	tggatcgata	aacctgtgaa	4560
gattgagtct	agtcgattta	ttggatgata	cattcttcat	cgtttttttc	ttgcttcgaa	4620
gttctgtata	accagatttg	tctgtgtgcg	attgtcatta	cctagccgtg	tatcgagaac	4680
tagggttttc	gagtcaattt	tgcccccttt	ggttatatct	ggttcgataa	cgattcatct	4740
ggattagggt	tttaagtggg	gacgtttagt	attccaattt	cttcaaaatt	tagttatgga	4800
taatgaaaat	ccccaattga	ctgttcaatt	tcttgttaaa	tgcgagatc	cccatggctt	4860
cgatctctc	ctcagtcgag	accgttagcc	ggaccgcccc	tgctcaggcc	aacatgggtg	4920
ctccgttcac	cggccttaag	tccaacgccg	ccttccccac	caccaagaag	gctaacgact	4980
tctccaccct	tccagcaaac	gggtggaagag	ttcaatgtat	gcagggtgtg	ccggcctacg	5040
gcaacaagaa	gttcgagacg	ctgtcgtacc	tgccgcccgt	gtctatggcg	cccaccgtga	5100
tgatggcctc	gtcggccacc	gccgtcgtc	cgttccaggg	gctcaagtcc	accgccagcc	5160
tccccgtcgc	ccgccgtcc	tccagaagcc	tcggcaacgt	cagcaacggc	ggaaggatcc	5220
ggtgcatggc	cggcgccgag	gagatcgtgc	tgagcccat	caaggagatc	tccggcaccg	5280
tcaagctgcc	gggggtccaa	tcgctttcca	accggatcct	cctactcgcc	gccctgtccg	5340
aggggacaac	agtggttgat	aacctgctga	acagtgagga	tgtccactac	atgctcgggg	5400
ccttgaggac	tcttggtctc	tctgtcgaag	cggacaaagc	tgccaaaaga	gctgtagtgt	5460
ttggctgtgg	tggaaagtcc	ccagttgagg	atgctaaaga	ggaagtgcag	ctcttcttgg	5520
ggaatgctgg	aatcgcaatg	cggtccttga	cagcagctgt	tactgctgct	gggtggaaatg	5580
caacttacgt	gcttgatgga	gtaccaagaa	tgaggagag	accattggc	gacttggttg	5640
tcggattgaa	gcagcttggg	gcagatgttg	attgtttcct	tggcactgac	tgccacctg	5700
ttcgtgtcaa	tggaaatcga	gggtacctg	gtggcaagg	caagctgtct	ggctccatca	5760
gcagtcagta	cttgagtgcc	ttgctgatgg	ctgctccttt	ggctcttggg	gatgtggaga	5820
ttgaaatcat	tgataaatta	atctccattc	cgtacgtcga	aatgacattg	agattgatgg	5880
agcgttttgg	tgtgaaagca	gagcattctg	atagctggga	cagattctac	attaagggag	5940
gtcaaaaata	caagtcccct	aaaaatgcct	atgttgaagg	tgatgcctca	agcgcaagct	6000
atttcttggc	tgggtgctgca	attactggag	ggactgtgac	tgtggaagg	tgtggcacca	6060

```

ccagtttgca gggatgatgtg aagtttgctg aggtactgga gatgatggga gcgaagggtta 6120
catggaccga gactagcgta actgttactg gcccaccgcg ggagccattt gggaggaaac 6180
acctcaaggc gattgatgtc aacatgaaca agatgcctga tgtcgccatg actcttgctg 6240
tggttgccct ctttgccgat ggcccgacag ccatcagaga cgtggcttcc tggagagtaa 6300
aggagaccga gaggatgggt gcgatccgga cggagctaac caagctggga gcatctgttg 6360
aggaagggcc ggactactgc atcatcacgc cgccggagaa gctgaacgtg acggcgatcg 6420
acacgtacga cgaccacagg atggcgatgg ctttctccct tgccgcctgt gccgagggtcc 6480
ccgtcaccat ccgggaccct ggggtgcaccc ggaagacctt ccccgactac ttcgatgtgc 6540
tgagcacttt cgtcaagaat taagctctag aactagtgga tccccgatc cgcgtttgtg 6600
ttttctgggt ttctcactta agcgtctgcg ttttactttt gtattgggtt tggcgtttag 6660
tagtttgctg tagcgttctt gttatgtgta attacgcttt ttcttcttgc ttcagcagtt 6720
tcggttgaaa tataaatcga atcaagtttc actttatcag cgttgtttta aattttggca 6780
ttaaattgggt gaaaattgct tcaattttgt atctaaatag aagagacaac atgaaattcg 6840
acttttgacc tcaaattctt gaacatttat ttcctgattt cacgatggat gaggataacg 6900
aaagggcggt tcctatgtcc gggaaagttc ccgtagaaga caatgagcaa agctactgaa 6960
acgcggacac gacgtcgcat tggtagcgat atgagttaaa ccgactcaat tcctttatta 7020
agacataaac cgattttgggt taaagtgtaa cagttagctg atataaaacc gaaacaaacc 7080
ggtacaagtt tgattgagca acttgatgac aaacttcaga attttggtta ttgaatgaaa 7140
atcatagtct aatcgtaaaa aatgtacaga agaaaagcta gagcagaaca aagattctat 7200
attctggttc caatttatca tcgctttaac gtccctcaga tttgatcggg ctgcaggaat 7260
taaacgcccg ggcacgtggg atcctctaga gtcgac 7296

```

<210> 2
 <211> 1843
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220> Vùng bên sườn ở đầu tận cùng 5' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ
 <223> EE-GM3

<220> Đặc điểm hỗn tạp
 <221> (1) .. (1451)
 <223> ADN của cây trồng bên sườn ở đầu tận cùng 5'

<220> đặc điểm hỗn tạp
 <221> (1452) .. (1843)
 <223> đoạn cài xen của ADN lạ

```

<400> 2
gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat 60
atatatatattc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtatttt ctaatacatt 120
tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaaatcat aaaattaagt aagtttcaca 180
taacatccaa tgattttctc gtaattttta gactggacta aagaatatag tagtaacact 240
tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag 300
gaaagctgaa catcaattgg tacacttgga tggttccac gggtttattat tgtctacatc 360
tggtcatcca agcagagggt atacttctta taactcgaca aatcttcgtt gtgcctatat 420
agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcgta tacaatctat gattcacagt 480
tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat 540
tctaaaaatat atagaataca atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc 600
atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaatacta ctagaaacaa 660
aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat 720
atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaattt atgaaaaata 780
atacttctat atttctatac atgtttctat acatgcgttt caatgtctga tagtgatagg 840
aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt 900
gtgtgtgttt tcatctacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
tttttatttt ttatccttaa aatactttta ataataattt ttcctattta aagcattttt 1020
tataatttta agcgctattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
aaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaatactaa attacaggaa 1140
agaaaaatat attcaaactt ttatgtttta aggtttttga atatttctct gattcgtttg 1200
aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaaaca 1320
ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa 1380
ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
attatattta tgtagctttg ctcatgtctt tctacgggaa ctttcccga cataggaacc 1500
gccctttcgt tatcctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aattttcacc 1620
aatttaatgc caaaatttaa aacaacgtg tcctgatttc acgatggatg aggataacga 1680
aagggcggtt cctatgtccg ggaaagttcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa 1740
cgcggaacac acgtcgcatt ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
gacataaacc gattttgggt aaagtgtaac agtgagctga tat 1843

```

<210> 3
 <211> 1408
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự bên sườn ở đầu tận cùng 3' của ADN lạ chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ EE-GM3

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1) . . (240)
 <223> đoạn cài xen của ADN lạ

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (241) . . (1408)
 <223> ADN của cây trồng

<400> 3
 taacagtgtgag ctgatataaa accgaaacaa accggtacaa gtttgattga gcaacttgat 60
 gacaaacttc agaattttgg ttattgaatg aaaatcatag tctaatacgta aaaaatgtac 120
 agaagaaaag ctagagcaga acaaagattc tatattcttg ttccaattta tcatcgcttt 180
 aacgtccctc agatttgatc gggctgcagg aattaatgtg gttcatccgt ctttttgta 240
 atgcggtcat caatacgtgc ctcaaagatt gccaaataga ttaatgtggt tcatctccct 300
 atatgttttg cttgttggat ttgctatca catgtttatt gctccaaact aattataata 360
 aaatgacttt caaatgattg gtgttgacat tcttttcaaa ttgttcgctg aagaaaagat 420
 aatctcgagg ccttgatttg ttaatgcttt cattaataaa taaataaaat aactctttcc 480
 aaatttcaat tcatgctttt atattgtgtg gttcatcctc atcttatgtc actattatca 540
 tttcatgttt gagactttac ttggccatat ttgagaagac cttcttcatt ataggcaatt 600
 ttatctccac aataatataa gagaatatct tgaattaata attattgagg atatattata 660
 gggttctatg tggaaactaaa gacatggta cccattaag agagagtata gaggaattac 720
 ttttatttgc cacgaggcga cgcgacttgt atttattttg gaattgtact ttgctgtgag 780
 cagtgtggct ctatgttggg gcctccactt gttggtgttt tatatatgtg aaaggaggat 840
 gaggggtgatg gttcatttct ttgcattatt tttgttattc gcgcgaatga tatatgccct 900
 gtttttgaag attgataggg aagtccatat ataggaattg aagtgtcaaa aggggtgtgag 960
 tatgtgctat gataatcacc caattaatgt acatctggtg tgggtgtttga atttgtaggt 1020
 cattaattaa tattcctctt ggtgaagttt ggagttcttt tgcaattaca attctgtttt 1080
 gtaagtgatt atgatggact tttagatgtt tctcaaacag taggtgtaaa gaaaaatggg 1140
 ccctggatg aaaatttgtt ttcactcttt ctattcata tctttaaaaa aagaatgata 1200
 attttgaat aaaaataaaa aaatattaaa tattttctca aatcaaacaa cttttatttt 1260

ttatgccaac aataattttg tttaaagatgg agattttcaat tattatataa gagttcatta 1320
 tagttgaaaa ttgaatgaat gtatatgttt acgttttttg tctcaagtga aactaagatc 1380
 aaatattcat atctattgag ctggtctt 1408

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn môi SOY028
 <400> 4
 atcgctttaa cgtccctcag 20

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn môi SOY029
 <400> 5
 caaggcctcg agattatc 18

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn môi SMP187
 <400> 6
 atatcaaccg gtagctcgac 20

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn môi STV019
 <400> 7
 ggcattaaat tggtagaaat tgc 23

<210> 8
 <211> 263
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự nucleotit của đơn vị siêu sao chép PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi SOY028 - SOY029

<400> 8
 atcgctttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt tcatccgtct 60
 ttttggttaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt aatgtgggtc 120
 atctccctat atgttttgct tgttggtttt tgctatcaca tgtttattgc tccaaactaa 180
 ttataataaa atgactttca aatgattggg gttgacattc tttcaaatt gttcgctgaa 240
 gaaaagataa tctcgaggcc ttg 263

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi 1 để khuếch đại đoạn đối chứng (SOY01)

<400> 9
 gtcagccaca cagtgcctat 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi 2 để khuếch đại đoạn đối chứng (SOY02)

<400> 10
 gttaccgtac aggtctttcc 20

<210> 11
 <211> 4076
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của pB2/P35SACK

<220>
 <221> gen khởi đầu
 <222> (461) . . (1003)
 <223> trình tự khởi đầu CamV35S

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1004) . . (1011)
 <223> trình tự ghi mã tổng hợp cho phosphinoaxetyltransferaza

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1582) . . (1784)
 <223> gen kết thúc CaMV 35S

<400> 11
 tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120
 ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
 accatatgca aacaaacata cacagcgact tatgctcaaa ttacaacggt atatatcctg 240
 ccacatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataaccg catcaggcgc 300
 cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggcgcggc ctcttcgcta 360
 ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg 420
 ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc 480
 aaatagagga cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga acagttcata cagagtctct 540
 tacgactcaa tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggg ggagcacgac acgcttgtct 600
 actccaaaaa tatcaaagat acagtctcag aagaccaaaag ggcaattgag acttttcaac 660
 aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg 720
 tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcca tcattgcgat aaaggaaagg 780
 ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga 840
 gcatcgttga aaaagaagac gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata 900
 tctccactga cgtaagggat gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttcctcta 960
 tataaggaag ttcatttcat ttggagagga caggggtaccc ggggatccac catgtctccg 1020
 gagaggagac cagttgagat taggccagct acagcagctg atatggccgc ggtttgtgat 1080
 atcgttaacc attacattga gacgtctaca gtgaacttta ggacagagcc acaaacacca 1140
 caagagtgga ttgatgatct agagagggtt caagatagat acccttggtt ggttgctgag 1200
 gttgaggggtg ttgtggctgg tattgcttac gctgggccct ggaaggctag gaacgcttac 1260
 gattggacag ttgagagtac tgtttacgtg tcacataggc atcaaagggtt gggcctagga 1320
 tccacattgt acacacattt gcttaagtct atggaggcgc aagggtttta gtctgtggtt 1380
 gctgttatag gccttccaaa cgatccatct gttagggttc atgaggcttt gggatacaca 1440
 gcccggggta cattgcgcgc agctggatac aagcatggtg gatggcatga tgttggtttt 1500
 tggcaaaggg attttgagtt gccagctcct ccaaggccag ttaggccagt taccagatc 1560
 tgagtcgacc tgcaggcatg cccgctgaaa tcaccagtct ctctctacaa atctatctct 1620
 ctctataata atgtgtgagt agttcccaga taagggaatt agggttctta tagggtttcg 1680
 ctcatgtgtt gagcatataa gaaaccctta gtatgtatgt gtatttgtaa aatacttcta 1740
 tcaataaaat ttctaattcc taaaaccaa atccagggcg agctcgaatt cgagctcggt 1800
 acccggggat cctctagagt cgacctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata 1860
 gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag 1920

cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg	1980
ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca	2040
acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc	2100
gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg	2160
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa	2220
ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga	2280
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag	2340
ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct	2400
taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg	2460
ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc	2520
ccccgttcag ccgaccgct gcgccttatt cggttaactat cgtcttgagt ccaaccgggt	2580
aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta	2640
tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac	2700
agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc	2760
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat	2820
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc	2880
tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttgggtcatg agattatcaa aaaggatctt	2940
cacctagatc cttttaaaatt aaaaatgaag ttttaaataca atctaaagta tatatgagta	3000
aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct	3060
atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgctcgttag ataactacga tacgggaggg	3120
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga	3180
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt	3240
atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt	3300
taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt	3360
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat	3420
gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc	3480
cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc	3540
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat	3600
gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag	3660
aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt	3720
accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc	3780
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa	3840

gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc aatattattg 3900
aagcatttat caggggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa 3960
taaacaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac 4020
cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtc 4076

<210> 12
<211> 720
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> trình tự nucleotit chứa vùng ở đầu tận cùng 5' bên sườn ADN lạ trong EE-GM1

<220>
<221> đặc điểm hỗn tạp
<222> (1) . . (209)
<223> ADN của cây trồng

<220>
<221> đặc điểm hỗn tạp
<222> (210) . . (720)
<223> ADN lạ

<400> 12
gagaagaaaa aggaaggcat taagagaccc tcctggcaca accctagaca ctctaagatc 60
ctttttcaaa cctgctccca ccatttcgag tcaagagata gataaataga cacatctcat 120
tgcaccgatc gggggcggtc gtagtgactg aggggggtcaa agaccaagaa gtgagttatt 180
tatcagccaa gcattctatt cttcttatgt cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc 240
tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 300
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga 360
cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga acagttcata cagagtctct tacgactcaa 420
tgacaagaag aaaatcttcg tcaacatggg ggagcacgac acgcttgtct actccaaaaa 480
tatcaaagat acagtctcag aagaccaaag ggcaattgag acttttcaac aaagggtaat 540
atccggaaac ctcttcggat tccattgccc agctatctgt cactttattg tgaagatagt 600
ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgcc aattgcgat aaaggaaagg ccatcgttga 660
agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcatcgtgga 720

<210> 13
<211> 1000
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>
<223> trình tự nucleotit chứa vùng bên sườn ở đầu tận cùng 3'

ADN trong EE-GM1

<220> đặc điểm hỗn tạp
 <221> (1) .. (568)
 <222> ADN lạ

<220> đặc điểm hỗn tạp
 <221> (569) .. (1000)
 <222> ADN của cây trồng

<400> 13
 ttccggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga 60
 ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac acgacttatac 120
 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 180
 agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 240
 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaca 300
 aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 360
 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 420
 ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 480
 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaaactt ggtctgacag 540
 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcaccttt aatctagatg atctgtctca actttaccaa 600
 aagttttgag cacatgtttg gattcacctt aaataatcta aaatcacagc ttgtttgatc 660
 ccaaaggagt taattctaag taaaattgat tgagttaaaa caattgtgtt agatagagaa 720
 attttctttg aataaaaaaca tctagacaca aatcatttca cttcaaaata attttaaaaa 780
 aaataaattt tgcaattcat tcatccaaac aaacatttga attaaactata atcaattcaa 840
 attgttacag tgtgttgcat tcatatcatt cctaataagt ctacattaaa gattaagagt 900
 gagaatgaga ggaagagaga acggtttcag gggttaaccct ttgtttggaa gaaccatcaa 960
 acagtggcaa cggatcatcc ttgctgcaaa acatagcttt 1000

<210> 14
 <211> 810
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220> trình tự nucleotit chứa vùng ở đầu tận cùng 5' bên sườn ADN lạ trong EE-GM2
 <223>

<220> đặc điểm hỗn tạp
 <221> (1) .. (311)
 <222> ADN của cây trồng

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (312) .. (810)
 <223> ADN lạ

<400> 14
 gtcacgctcg tcgcgctgga gttcttgtgg tgccgctggg cgactggag tttgggtgtt 60
 gttgttcatg cttgcgctgc taatccccctt ttgtatgcga aaatcgggtt tgggtcgggt 120
 cgggtcagcc caacacgacc taatttgtgt tacgaaaatt tcaacaaaaa aaaaaagtta 180
 tcttccgcca ttatcgccat tccgccacga tcattaaggc tatggcggcc gcaatggcgc 240
 cgccatatga aaccgcgaat gccatcgcta tttggtggca tttttccaaa aaccgcgaat 300
 gtcataccgt catcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg 360
 cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactggtg 420
 agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg 480
 cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa 540
 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt 600
 aaccactcg tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt 660
 gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aacgccaggg ttttcccagt 720
 cagcagcttg taaaacgacg gccagtgaat tcccatggag tcaaagattc aaatagagga 780
 cctaacagaa ctcgccgtaa agactggcga 810

<210> 15
 <211> 1880
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit chứa vùng ở đầu tận cùng 3' bên sườn ADN lạ trong EE-GM2

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1) .. (507)
 <223> ADN lạ

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (508) .. (1880)
 <223> ADN của cây trồng

<400> 15
 ctttttaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttgggtct 60
 gacagttacc aatgcttaat cagtggaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 120
 tccatagttg cctgactccc cgctgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 180

```

ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 240
ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc 300
atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg 360
cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gtcgctcgtt tggatatggct 420
tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccatt gttgtgcaaa 480
aaagcggtta gtccttcggg tcctccgatg gcaccgccat aaccacaatt taacaacttt 540
ataaatgact tagtatatta gcaatttatc ttgtcacatg cacatatattt ataactataa 600
taggagtttg agtttaaagt atgtaatgaa ttttggattg catgttgttt tgtactatat 660
tggtagcttt ttccaatgaa gtgttaaatt tgtatatttc atattcaggg tcacgtttga 720
ccttctctag tcaactgccct aattaagccc tttctcttgc actcttgatg cttacttaac 780
ctgggcatca ggcataatgta atgttatcaa tcaaactatc acgtttcatg catttattaa 840
tcttcattga tgcccttgtc tcgctcttgc ccttttttcc aatttatgct tcaaattctt 900
gacatgttcc atgtccttat tccttttctc tgtaactgtt cattttcgtt atgaaccatg 960
aagataaact actattgtta aagtctcggg tcaaatttaa cttttctgct tttccccata 1020
taattgaata agacttggtc gtggttggtc tcattgcata tacctttatt atatgcatag 1080
aagtgatttt ttgacctaac ttgtacattt ttttatggca gtgatganga tgtagagagg 1140
cttatcgagc ttgtgaaggg aatttcttgc aagattaatc taatctcatt caatccgcac 1200
agtggatcat tcttcaaacc aaccaaatat gaaaggatga ttgaattccg aaatacattg 1260
gctggggcag gattgatagt atttttaaga cttagtagag gtgatgatca attggcttcc 1320
tgtggtcaat tgggtaagcc tggcaccatt caagctccat ttcttcgtgt accagagcaa 1380
ttccaaatgg caattggaag ttcaacttga ttctttgtgg aggttctgtg gcaaattgat 1440
cttacagtta ttaacgaaga attatatagg acacttgttg tgggggtagc tagggatgac 1500
ttcactactga caatgcaaga ccaagagcta aattaggggg atgtctgtct gttttcatat 1560
tgtacttttc cattttacag ttaattgata tttttttttt tattaatgtg acggatccag 1620
attacttact ggctaagaaa taagaaataa aaatgattta aatatatttt tagtcgaagt 1680
ctgtattttt tagtttccca aattaaaatt tgcatttttt aatctctcat ttataaaatg 1740
cctttttaag ttcttcttag ctgatttttg gcaacttgga tgcacaatgt gcaactatcg 1800
taacaatatt tttcttgaaa tttaaagaga ctaaaatata tgttttacca taacactcat 1860
gttagtaaaa ccattatttg

```

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> nhân tạo

<220>	
<223> đoạn mồi SOY06	
<400> 16	
ggcgttcgta gtgactgagg	20
<210> 17	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> nhân tạo	
<220>	
<223> đoạn mồi SOY 07	
<400> 17	
gttttacaac gtcgtgactg g	21
<210> 18	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> nhân tạo	
<220>	
<223> đoạn mồi SOY 09	
<400> 18	
tgtggttatg gcggtgccat c	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> nhân tạo	
<220>	
<223> SOY 010	
<400> 19	
tgctacaggc atcgtggtgt c	21
<210> 20	
<211> 17806	
<212> ADN	
<213> nhân tạo	
<220>	
<223> trình tự nucleotit của ADN lạ và trình tự cây trồng bên sườn trong EE-GM3	
<400> 20	
gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat	60
atatatatattc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtatttt ctaatacatt	120
tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaaatcat aaaattaagt aagtttcaca	180
taacatccaa tgattttctc gtaattttaa gactggacta aagaatatag tagtaacact	240
tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag	300

gaaagctgaa catcaattgg tacacttggg tggttccac ggtttattat tgtctacatc 360
 tggatcatcca agcagagggtt atatcttcta taactcgaca aatcttcggt gtgcctatat 420
 agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcggtt tacaatctat gattcacagt 480
 tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat 540
 tctaaaatat atagaatata atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc 600
 atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaataatta ctagaaacaa 660
 aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat 720
 atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaatat atgaaaaata 780
 atacttctat atttctatac atgtttctat acatgcgttt caatgtctga tagtgatagg 840
 aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt 900
 gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt 960
 tttttatttt ttatccttaa aatactttta ataataattt ttcctattta aagcattttt 1020
 tataatttaa agcgctattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt 1080
 aaaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaatactaa attacaggaa 1140
 agaaaaatat attcaaactt ttatgtttta aggtttttga atatttctct gattcgtttg 1200
 aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt 1260
 gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaaaca 1320
 ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa 1380
 ttatttttta ttttaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat 1440
 attatattta tgtagctttg ctcatgtct tctacgggaa ctttcccga cataggaacc 1500
 gccctttcgt tatcctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt 1560
 caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aattttcacc 1620
 aatttaatgc caaaatttaa aacaacgtg tcctgatttc acgatggatg aggataacga 1680
 aagggcggtt cctatgtccg ggaaagttcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa 1740
 cgcgacacg acgtcgcat ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa 1800
 gacataaacc gattttggtt aaagtgtaac agtgagctga tataaaaccg aaacaaaccg 1860
 gtacaagttt gattgagcaa cttgatgaca aacttcagaa ttttggttat tgaatgaaaa 1920
 tcatagtcta atcgtaaaaa atgtacagaa gaaaagctag agcagaacaa agattctata 1980
 ttctggttcc aatttatcat cgctttaacg tcctcagat ttgatcgggc tgcaggaatt 2040
 aaacgcccgg gcacgtggga tcctctagag tcgactctag cagatctggc cggcccaccg 2100
 gtgggccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcggg acctacctgg cgaaaggggg 2160

atgtgctgca	aggcgattaa	gttgggtaac	gccagggttt	tcccagtcac	gacgttgtaa	2220
aacgacggcc	agtgaattgc	ggccgcaatt	cccgatctag	taacatagat	gacaccgcgc	2280
gcgataat	atcctagttt	gcgcgctata	ttttgttttc	tatcgcgat	taaatgtata	2340
attgcgggac	tctaatacata	aaaacccatc	tcataaataa	cgtcatgcat	tacatgttaa	2400
ttattacatg	cttaacgtaa	ttcaacagaa	attatatgat	aatcatcgca	agaccggcaa	2460
caggattcaa	tcttaagaaa	ctttattgcc	aaatgtttga	acgatcgggg	aaattcgtcg	2520
agtcaccctc	ggccgggctt	tttgacgctt	aatcggcggt	caatacacca	cgacgcacct	2580
ggtcacgttc	gatggactcg	aacagcgcct	tgaagttcca	ctcgccaaac	ccatcgctcg	2640
ccttgcgctg	gatgaattcg	aagaacaccg	ggcccatcag	ggtttccgag	aagatctgca	2700
gcagcaggcg	tttgctgcct	tccacggaag	atccgtccag	caggataaccg	cgtcctgca	2760
gttgatccac	cggctcgccg	tggtcaggca	ggcggccttc	gagcatttcg	taataagtgt	2820
ctggcggcgc	ggcatgaag	cgcatgccga	ttttcttcaa	cgcgctccag	gtcttgacca	2880
ggtcgtcgg	gaggaacgcc	acgtgctgga	tgccttcgcc	gttgaactgc	atcaggaact	2940
cttcgatctg	ccccgcgcc	ttggacgact	cttcgttcag	cgggatgcgg	atcatgccgt	3000
ccggcgcact	catggccttg	gaagtcaggc	cggtgtactc	gcccttgata	tcgaagtaac	3060
gcgcttcacg	gaagttgaac	aatttctcgt	agaagttggc	ccagtagacc	atgcggccgc	3120
gatagacgtt	gtgggtcagg	tggtcgatga	ctttgagacc	tgcaccgacc	ggattgcgct	3180
ccacaccttc	gaggtacacg	aagtcgatgt	cgtagatcga	gctgccttcg	ccgaaacgg	3240
cgatcaggta	caacggcgcg	ccgccgatgc	ccttgatcgc	cggcagggttc	aattccatcg	3300
gcccgggtgtc	aatatggatc	ggctgggcgc	cgagttccag	ggcgcgggtg	taggcctttt	3360
gcgagtcctt	cacgcggaac	gccatgccgc	acaccgacgg	gccgtgttcg	gccgcaaagt	3420
aggaggcgat	gctgttgggc	tcgttggtga	ggatcagggt	gatctcgccc	tggcggatca	3480
gggtgcacgtt	cttggaaacg	tgggtcgcg	ctttggtgaa	gcccattgatc	tcgaagatcg	3540
gctccagggt	acccggcgct	ggcgacgcga	attcgatgaa	ttcaaagccc	atcaggccca	3600
ttgggttttc	gtatagatct	gccatgcacc	ggatccttcc	gccgttgctg	acgttgccga	3660
ggcttctgga	ggagcggcgg	gcgacgggga	ggctggcggt	ggacttgagc	ccctggaacg	3720
gagcgacggc	ggtggccgac	gaggccatca	tcacgggtggg	cgccatagac	agcggcggca	3780
ggtacgacag	cgtctcgaac	ttcttggtgc	cgtaggccgg	ccacacctgc	atatattgaa	3840
ctcttccacc	gttgctggga	aggggtggaga	agtcgttagc	cttcttggtg	gtggggaagg	3900
cggcgttgga	cttaaggccg	gtgaacggag	ccaccatgtt	ggcctgagca	ggggcgggtcc	3960
ggctaacggt	cgcgactgag	gaggagatcg	aagccatggc	tatcgttcgt	aaatggtgaa	4020
aattttcaga	aaattgcttt	tgctttaaaa	gaaatgattt	aaattgctgc	aatagaagta	4080

gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttgtt ttgtatatgt tgtgttgaga attctagagt	4140
cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacggttaa gagtagattt gggtgagaaa	4200
gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat tttttgagca atcagatcgc	4260
atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca ataaaatgat gtataaaccg	4320
tcgatctgtt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg tgatggcagt gatagccact	4380
aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag ggtaatgaag cggcaatatt	4440
ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg aaaattttca catgctttta	4500
ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga tttataatat agtgatttat	4560
actaattttg tagtagctta atgtatatgt atactggaaa aacaatgaca atcataatcg	4620
atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct gttttaatcg acggttcata	4680
ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc gtcttttggt ttacatgtgg	4740
cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaac tcggaaaata aaattgcgcc	4800
atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa aaccacgaa ttacaagtta	4860
caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tataactaatt ttgtagtagc ttaatgtata	4920
ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta tcaagttatc gtattgatat	4980
tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc ataaatatca ccaaatttac	5040
aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg tcaacatttt aatttcctt	5100
tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa agtaactatt tacataagag	5160
gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca ctcacaaata caaacagagc	5220
acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtggc ggtttcatta caattgtgtc	5280
acttgacga caaactatct tgctctggga atcatctcag catcaaagat catgctcact	5340
tcaggggaac ttagtgtatc catgcctcga ctcatatttc tcctcgacct gcaggcatgc	5400
aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag tcgcgacgta cgttcgaaca	5460
attggtttta aaagcttgca tgcctgcagg tcgaggagaa atatgagtcg aggcattgat	5520
acactaagtt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg agatgattcc cagagcaaga	5580
tagtttgtgc tgcaagtgac acaattgtaa tgaaaccacc actcaacgaa tttacttgtg	5640
gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc cggttggtaa ttatttttgt	5700
taatgtgatt ttaaaacctc ttatgtaaat agttacttta tctattgaag tgtgttcttg	5760
tggtctatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat cccatttaca attgataact	5820
tggtatacac aaactttgta aatttggtga tatttatggt cgaaagaagg caatacccat	5880
tgtatgttcc aatatcaata tcaatcagat aacttgataa tactaacata tgattgtcat	5940

tgtttttcca	gtatcaatat	acattaagct	actacaaaat	tagtataaat	cactatatta	6000
taaatctttt	tcggttgtaa	cttgtaattc	gtgggttttt	aaaataaaaag	catgtgaaaa	6060
ttttcaaata	atgtgatggc	gcaattttat	tttccgagtt	ccaaaatatt	gccgcttcac	6120
taccctaatt	tgtggcgcca	catgtaaaac	aaaagacgat	tcttagtggc	tatcactgcc	6180
atcacgcgga	tcactaatat	gaaccgtcga	ttaaaacaga	tcgacggttt	atacatcatt	6240
ttattgtaca	cacggatcga	tatctcagcc	gttagattta	atatgcgatc	tgattgctca	6300
aaaaatagac	tctccgtctt	tgcctataaa	aacaatttca	catctttctc	acccaaatct	6360
actcttaacc	gttcttcttc	ttctacagac	atcaatttct	ctcgactcta	gaggatccaa	6420
gcttatcgat	ttcgaacccc	tcaggcgaag	aacagggtatg	atttgtttgt	aattagatca	6480
ggggtttagg	tctttccatt	actttttaat	gttttttctg	ttactgtctc	cgcgatctga	6540
ttttacgaca	atagagtttc	gggttttgtc	ccattccagt	ttgaaaataa	aggtccgtct	6600
tttaagtttg	ctggatcgat	aaacctgtga	agattgagtc	tagtcgattt	attggatgat	6660
ccattcttca	tcgttttttt	cttgcttcga	agttctgtat	aaccagattt	gtctgtgtgc	6720
gattgtcatt	acctagccgt	gtatcgagaa	ctagggtttt	cgagtcaatt	ttgccccctt	6780
tggttatatc	tggttcgata	acgattcatc	tggattaggg	ttttaagtgg	tgacgttttag	6840
tattccaatt	tcttcaaaat	ttagttatgg	ataatgaaaa	tccccaattg	actgttcaat	6900
ttcttgtaa	atgcgcagat	ccccatggct	tcgatctcct	cctcagtcgc	gaccgttagc	6960
cggaccgccc	ctgctcaggc	caacatggtg	gtccggttca	ccggccttaa	gtccaacgcc	7020
gccttcccca	ccaccaagaa	ggctaacgac	ttctccaccc	ttcccagcaa	cggtggaaga	7080
gttcaatgta	tgcagggtgtg	gccggcctac	ggcaacaaga	agttcgagac	gctgtcgtac	7140
ctgccgccc	tgtctatggc	gccaccgtg	atgatggcct	cgtcggccac	cgccgtcgtc	7200
ccgttccagg	ggctcaagtc	caccgccagc	ctccccgtcg	cccgccgctc	ctccagaagc	7260
ctcggcaacg	tcagcaacgg	cggaaggatc	cggtgcatgg	ccggcgccga	ggagatcgtg	7320
ctgcagccca	tcaaggagat	ctccggcacc	gtcaagctgc	cggggtccaa	gtcgctttcc	7380
aaccggatcc	tcctactcgc	cgcctgtcc	gaggggacaa	cagtggttga	taacctgctg	7440
aacagtgagg	atgtccacta	catgctcggg	gccttgagga	ctcttggtct	ctctgtcgaa	7500
gcggacaaa	ctgccaaaag	agctgtagtt	gttggtgtgtg	gtggaaagt	cccagttgag	7560
gatgctaaag	aggaagtgca	gtctttcttg	gggaatgctg	gaatcgcaat	gcggtccttg	7620
acagcagctg	ttactgctgc	tggtggaaat	gcaacttacg	tgcttgatgg	agtaccaaga	7680
atgagggaga	gacccattgg	cgacttggtt	gtcggattga	agcagcttgg	tgcatgtgtt	7740
gattgtttcc	ttggcactga	ctgccacct	gttcgtgtca	atggaatcgg	agggctacct	7800
ggtggcaagg	tcaagctgtc	tggctccatc	agcagtcagt	acttgagtgc	cttgctgatg	7860

gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca ttgataaatt aatctccatt	7920
ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gagcgttttg gtgtgaaagc agagcattct	7980
gatagctggg acagattcta cattaaggga ggtcaaaaat acaagtcccc taaaaatgcc	8040
tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg ctgggtgctgc aattactgga	8100
gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc agggatgatgt gaagtttgct	8160
gaggtactgg agatgatggg agcgaagggt acatggaccg agactagcgt aactgttact	8220
ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg cgattgatgt caacatgaac	8280
aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc tctttgccga tggcccgaca	8340
gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg agaggatggt tgcgatccgg	8400
acggagctaa ccaagctggg agcatctgtt gaggaagggc cggactactg catcatcacg	8460
ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg acgaccacag gatggcgatg	8520
gctttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca tccgggacct tgggtgcacc	8580
cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt tcgtcaagaa ttaagctcta	8640
gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg tttctcactt aagcgtctgc	8700
gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg gtagcgttct tgttatgtgt	8760
aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa atataaatcg aatcaagttt	8820
cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg tgaaaattgc ttcaattttg	8880
tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac ctcaaattctt cgaacattta	8940
tttcttgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg ttcctatgtc cgggaaagtt	9000
cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca cgacgtcgca ttggtacgga	9060
tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa ccgatttttg ttaaagtgtg	9120
acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cggtagaagt ttgattgagc aacttgatga	9180
caaacttcag aattttggtt attgaatgaa aatcatagtc taatcgtaaa aaatgtacag	9240
aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt ccaatttatc atcgcttta	9300
cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaaaccgcc gggcacgtgg gatcctctag	9360
cagatctggc cggcccaccg gtgggccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcgg	9420
acctacctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccaggggtt	9480
ttccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag	9540
taacatagat gacaccgcgc gcgataattt atcctagttt gcgcgctata ttttgttttc	9600
tatcgctat taaatgtata attgcgggac tctaatacata aaaacccatc tcataaataa	9660
cgtcatgcat tacatgttaa ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat	9720

aatcatcgca	agaccggcaa	caggattcaa	tcttaagaaa	ctttattgcc	aaatgtttga	9780
acgatcgggg	aaattcgtcg	agtcaccctc	ggccgggctt	tttgacgctt	aatcggcggt	9840
caatacacca	cgacgcacct	ggtcacgttc	gatggactcg	aacagcgctt	tgaagttcca	9900
ctcgccaaac	ccatcgctcg	ccttgcgctg	gatgaattcg	aagaacaccg	ggcccatcag	9960
ggtttccgag	aagatctgca	gcagcaggcg	tttgctgcct	tccacggaag	atccgtccag	10020
caggataccg	cgtgcctgca	gttgatccac	cggctcgccg	tggtcaggca	ggcggccttc	10080
gagcatttcg	taataagtgt	ctggcggcgc	ggcatgaag	cgcatgccga	ttttcttcaa	10140
cgcgtcccag	gtcttgacca	ggtcgtcggg	gaggaacgcc	acgtgctgga	tgccttcgcc	10200
gttgaactgc	atcaggaact	cttcgatctg	ccccgcgccc	ttggacgact	cttcgttcag	10260
cgggatgcgg	atcatgccgt	ccggcgcact	catggccttg	gaagtcaggc	cgggtgtactc	10320
gcccttgata	tcgaagtaac	gcgcttcacg	gaagttgaac	aatttctcgt	agaagttggc	10380
ccagtagacc	atgcggccgc	gatagacgtt	gtgggtcagg	tggtcgatga	ctttgagacc	10440
tgcaccgacc	ggattgcgct	ccacaccttc	gaggtacacg	aagtcgatgt	cgtagatcga	10500
gctgccttcg	ccgaaacggt	cgatcaggta	caacggcgcg	ccgccgatgc	ccttgatcgc	10560
cggcaggttc	aattccatcg	gcccgggtgc	aatatggatc	ggctgggcgc	cgagttccag	10620
ggcgcggttg	taggcctttt	gcgagtcctt	cacgcggaac	gccatgccgc	acaccgacgg	10680
gccgtgttcg	gccgcaaagt	aggaggcgat	gctgttgggc	tcgttgttga	ggatcagggt	10740
gatctcgccc	tggcggtaca	ggtgcacgtt	cttggaacgg	tggtcgcga	ctttggtgaa	10800
gcccattgatc	tcgaagatcg	gctccagggt	acccggcgctc	ggcgacgcga	attcgatgaa	10860
ttcaaagccc	atcaggccca	ttgggttttc	gtatagatct	gccatgcacc	ggatccttcc	10920
gccgttgctg	acgttgccga	ggcttctgga	ggagcggcgg	gcgacgggga	ggctggcggt	10980
ggacttgagc	ccctggaacg	gagcgacggc	ggtggccgac	gaggccatca	tcacggtggg	11040
cgccatagac	agcggcggca	ggtacgacag	cgtctcgaac	ttcttgttgc	cgtaggccgg	11100
ccacacctgc	atatattgaa	ctcttcacc	gttgctggga	aggggtggaga	agtcgttagc	11160
cttcttggtg	gtggggaagg	cggcgttgga	cttaaggccg	gtgaacggag	ccaccatggt	11220
ggcctgagca	ggggcggtcc	ggctaacggt	cgcgactgag	gaggagatcg	aagccatggc	11280
tatcgttcgt	aaatggtgaa	aattttcaga	aaattgcttt	tgctttaaaa	gaaatgattt	11340
aaattgctgc	aatagaagta	gaatgcttga	ttgcttgaga	ttcgtttggt	ttgtatatgt	11400
tgtgttgaga	attctagagt	cgagagaaat	tgatgtctgt	agaagaagaa	gaacggttaa	11460
gagtagattt	gggtgagaaa	gatgtgaaat	tgtttttata	ggcaaagacg	gagagtctat	11520
tttttgagca	atcagatcgc	atattaaatc	taacggctga	gatatcgatc	cgtgtgtaca	11580
ataaaatgat	gtataaaccg	tcgatctggt	ttaatcqacg	gttcatatta	gtgatccgcg	11640

tgatggcagt gatagccact aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag 11700
 ggtaatgaag cggcaatatt ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg 11760
 aaaattttca catgctttta ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga 11820
 tttataatat agtgatttat actaattttg tagtagctta atgtatatg atactggaaa 11880
 aacaatgaca atcataatcg atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct 11940
 gttttaatcg acggttcata ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc 12000
 gtcttttggt ttacatgtgg cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaac 12060
 tcggaaaata aaattgcgcc atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa 12120
 aaccacgaa ttacaagta caaccgaaaa agatttataa tatagtgatt tataactaatt 12180
 ttgtagtagc ttaatgtata ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta 12240
 tcaagttatc gtattgatat tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc 12300
 ataaatatca ccaaatttac aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg 12360
 tcaacatttt aatttccctt tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa 12420
 agtaactatt tacataagag gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca 12480
 ctcacaaata caaacagagc acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtgg 12540
 ggtttcatta caattgtgtc acttgacgca caaactatct tgctctggga atcatctcag 12600
 catcaaagat catgctcact tcaggggaac ttagtgatc catgcctcga ctcatatttc 12660
 tcctcgacct gcaggcatgc aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag 12720
 tcgcgacgta cgttcgaaca attggtttta aaagcttgca tgcctgcagg tcgaggagaa 12780
 atatgagtcg aggcatggat aactaagtt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg 12840
 agatgattcc cagagcaaga tagtttgtgc tgcaagtgc acaattgtaa tgaaaccacc 12900
 actcaacgaa tttacttggt gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc 12960
 cggttggtaa ttatttttgt taatgtgatt ttaaaacctc ttatgtaaat agttacttta 13020
 tctattgaag tgtgttcttg tggcttatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat 13080
 cccatttaca attgataact tggatatac aaactttgta aatttggtga tatttatgg 13140
 cgaaagaagg caatacccat tgtatgttcc aatatcaata tcaatacgat aacttgataa 13200
 tactaacata tgattgtcat tgtttttcca gtatcaatat acattaagct actacaaaat 13260
 tagtataaat cactatatta taaatctttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt 13320
 aaaataaaag catgtgaaaa ttttcaaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt 13380
 ccaaaatatt gccgcttcat taccctaatt tgtggcgcca catgtaaaac aaaagacgat 13440
 tcttagtggc tatcactgcc atcacgcgga tcactaatat gaaccgtcga ttaaaacaga 13500

tcgacggttt atacatcatt ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta 13560
 atatgcgatc tgattgctca aaaaatagac tctccgtctt tgccataaaa aacaatttca 13620
 catctttctc acccaaatct actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct 13680
 ctcgactcta gaggatccaa gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacaggatatg 13740
 atttgtttgt aattagatca ggggtttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg 13800
 ttactgtctc cgcgatctga ttttacgaca atagagtttc gggttttgct ccattccagt 13860
 ttgaaaataa aggtccgtct ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc 13920
 tagtcgattt attggatgat ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat 13980
 aaccagattt gtctgtgtgc gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt 14040
 cgagtcaatt ttgccccctt tggttatatc tggttcgata acgattcatc tggattaggg 14100
 ttttaagtgg tgacgttttag tattccaatt tcttcaaaat ttagttatgg ataataaaaa 14160
 tccccaatg actgttcaat ttcttgtaa atgcgagat ccccatggct tcgatctcct 14220
 cctcagtcgc gaccgttagc cggaccgccc ctgctcaggc caacatggtg gctccgttca 14280
 ccggccttaa gtccaacgcc gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccaccc 14340
 ttcccagcaa cggtggaaga gttcaatgta tgcagggtg gccggcctac ggcaacaaga 14400
 agttcgagac gctgtcgtac ctgccgccgc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct 14460
 cgtcggccac cgccgtcgtc ccgttccagg ggctcaagtc caccgccagc ctccccgtcg 14520
 cccgccgtc ctccagaagc ctcggaacg tcagcaacgg cggaaggatc cggtgcatgg 14580
 ccggcgccga ggagatcgtg ctgcagcca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc 14640
 cggggtccaa gtcgctttcc aaccgatcc tcctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa 14700
 cagtgggtga taacctgctg aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga 14760
 ctcttggctc ctctgtcgaa gcggacaaag ctgccaaaag agctgtagtt gttggctgtg 14820
 gtgaaagt cccagttgag gatgctaaag aggaagtgc gctcttcttg gggaatgctg 14880
 gaatcgcaat gcggtccttg acagcagctg ttactgtgc tggtggaat gcaacttacg 14940
 tgcttgatgg agtaccaaga atgaggaga gacccattgg cgacttggtt gtcggattga 15000
 agcagcttgg tgcagatggt gattgtttcc ttggcactga ctgccacct gttcgtgtca 15060
 atggaatcgg agggctacct ggtggcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt 15120
 acttgagtgc cttgctgatg gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca 15180
 ttgataaatt aatctccatt ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gagcgttttg 15240
 gtgtgaaagc agagcattct gatagctggg acagattcta cattaagga ggtcaaaaat 15300
 acaagtcccc taaaaatgcc tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg 15360
 ctggtgctgc aattactgga gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc 15420

agggatgatgt gaagtttgct gaggtactgg agatgatggg agcgaagggtt acatggaccg 15480
 agactagcgt aactgttact ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg 15540
 cgattgatgt caacatgaac aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtgggttgccc 15600
 tctttgccga tggcccgaca gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg 15660
 agaggatggt tgcgatccgg acggagctaa ccaagctggg agcatctggt gaggaagggc 15720
 cggactactg catcatcacg cgcgaggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg 15780
 acgaccacag gatggcgatg gctttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca 15840
 tccgggaccc tgggtgcacc cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt 15900
 tcgtcaagaa ttaagctcta gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg 15960
 tttctcactt aagcgtctgc gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg 16020
 gtagcgttct tgttatgtgt aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa 16080
 atataaatcg aatcaagttt cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg 16140
 tgaaaattgc ttcaattttg tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac 16200
 ctcaaacttt cgaacattta tttcctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg 16260
 ttcctatgtc cgggaaagtt cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca 16320
 cgacgtcgca ttggtacgga tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa 16380
 ccgatttttg ttaaagtgtg acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cggtagaagt 16440
 ttgattgagc aacttgatga caaacttcag aattttgggt attgaatgaa aatcatagtc 16500
 taatcgtaaa aaatgtacag aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt 16560
 ccaatttatc atcgttttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggt 16620
 tcatccgtct ttttggtaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt 16680
 aatgtggttc atctccctat atgttttgct tgttggtatt tgctatcaca tgtttattgc 16740
 tccaaactaa ttataataaa atgactttca aatgattggg gttgacattc tttcaaatt 16800
 gttcgctgaa gaaaagataa tctcgaggcc ttgatttggt aatgctttca ttaataaata 16860
 aataaaataa ctctttccaa atttcaattc atgcttttat attgtgtggt tcatcctcat 16920
 cttatgtcac tattatcatt tcatgtttga gactttactt ggccatattt gagaagacct 16980
 tcttcattat aggcaatttt atctccacaa taatataaga gaatatcttg aattaataat 17040
 tattgaggat atattatagg gttctatgtg gaactaaaga catggttacc ccattaagag 17100
 agagtataga ggaattactt ttatttgcca cgaggcgacg cgacttgat ttattttgga 17160
 attgtacttt tgcgtgagca gtgtggctct atgttggggc ctccacttgt tgggtgttta 17220
 tatatgtgaa aggaggatga gggatgatgg tcatctcttt gcattatttt tgttattcgc 17280

gcgaatgata tatgccctgt ttttgaagat tgatagggaa gtccatatat aggaattgaa 17340
 gtgtcaaaag ggtgtgagta tgtgctatga taatcaccca attaattgtac atctgggtgtg 17400
 gtgtttgaat ttgtaggtca ttaattaata ttcctcttgg tgaagtttgg agttcttttg 17460
 caattacaat tctgttttgt aagtgattat gatggacttt tagatgtttc tcaaacagta 17520
 ggtgtaaaga aaaatgggcc ctggtatgaa aatttgtttt cactctttct cattcatatc 17580
 tttaaaaaaa gaatgataat tttgtaataa aaataaaaaa atattaaata ttttctcaaa 17640
 tcaaacaacc tttatttttt atgccaacaa taattttgtt aaagatggag atttcaatta 17700
 ttatataaga gttcattata gttgaaaatt gaatgaatgt atatgtttac gttttttgtc 17760
 tcaagtgaat ctaagatcaa atattcatat ctattgagct ggtcctt 17806

<210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SHA130

<400> 21
 ctatattctg gttccaattt atc 23

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SMP178

<400> 22
 tgaggcacgt attgatgacc 20