



(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)



1-0027115

(51)⁷ C12N 15/11; C12Q 1/68; C12N 15/32

(13) B

(21) 1-2013-03181

(22) 24/05/2007

(62) 1-2008-03112

(86) PCT/US2007/012301 24/05/2007

(87) WO/2007/142840 13/12/2007

(30) 60/810,499 03/06/2006 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/06/2009 255A

(73) SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (CH)

Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Switzerland

(72) LONG, Nykoll (US); PULLIAM, Derrick (US); BOTTOMS, Jeff (US); MEGHJI, Moez (US); HART, Hope (US); QUE, Qiudeng (CN).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC PHÂN LẬP ĐƯỢC CÓ TRÌNH TỰ NUCLEOTIT LÀ DUY NHẤT ĐỐI VỚI DÒNG MIR162

(57) Sáng chế đề cập đến dòng ngô chuyển gen mới MIR162. Sáng chế đề cập đến các axit nucleic là duy nhất đối với dòng MIR162 và đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của dòng MIR162 dựa trên các trình tự ADN của các cấu trúc tái tổ hợp được chèn vào hệ gen ngô để thu được dòng MIR162 và của trình tự hệ gen nằm ở gần kề vị trí chèn. Sáng chế còn đề cập đến cây ngô có mang kiểu gen chuyển MIR162 và phương pháp tạo ra cây ngô bằng lai giống cây ngô mang kiểu gen MIR162 với chính nó hoặc với giống ngô khác. Hạt của các cây ngô mang kiểu gen MIR162 cũng được đề cập. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp phòng trừ sâu bệnh bằng cách sử dụng cây ngô MIR162.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực sinh học phân tử thực vật, biến nạp thực vật và lai giống thực vật. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến cây ngô chuyển gen kháng côn trùng mang kiểu gen mới do chuyển gen và các phương pháp phát hiện sự có mặt của các axit nucleic là duy nhất đối với cây ngô chuyển gen trong mẫu và các chế phẩm của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các sinh vật gây hại ở thực vật là nhân tố chủ yếu trong sự thiệt hại của các cây nông nghiệp quan trọng của thế giới. Hằng năm, chỉ tính riêng ở Mỹ có khoảng 8 tỷ đô la bị mất do sự phá hoại của các sinh vật gây hại không phải động vật có vú, bao gồm các loài côn trùng. Ngoài các tổn thất gây cho các cây trồng, côn trùng có hại còn là gánh nặng cho các người trồng rau và hoa quả, các nhà sản xuất hoa để trang trí và các người làm vườn gia đình.

Côn trùng có hại phần lớn được phòng trừ bằng việc sử dụng mạnh mẽ các thuốc trừ sâu hóa học hoạt động thông qua việc ức chế sinh trưởng của côn trùng, ngăn không cho chúng ăn hoặc sinh sản hoặc gây chết. Nhờ đó có thể phòng trừ tốt côn trùng, nhưng đôi khi các hóa chất này cũng có thể ảnh hưởng đến các côn trùng có lợi khác. Một vấn đề nữa, do sử dụng rộng rãi hóa chất diệt côn trùng, xuất hiện nhiều loại côn trùng kháng thuốc. Điều này đã được giảm bớt phần nào bằng nhiều cách khác nhau nhằm kiểm soát hiện tượng kháng thuốc, nhưng nhu cầu về các tác nhân phòng trừ loài gây hại thay thế vẫn gia tăng. Các tác nhân phòng trừ loài gây hại có bản chất sinh học, ví dụ, các chủng *Bacillus thuringiensis* (Bt) biểu hiện độc tố diệt loài gây hại như các nội độc tố đã được sử dụng cho các cây trồng cho kết quả mỹ mãn, đem lại một biện pháp thay thế hoặc bổ sung cho các thuốc trừ sâu hóa học. Các gen mã hóa một số nội độc tố đã được phân lập và sự biểu hiện của chúng trong các vật chủ khác loại đã được thể hiện để cung cấp một cách thức khác để phòng trừ các côn trùng gây hại quan trọng về mặt kinh tế. Cụ thể hơn, sự biểu hiện của nội độc tố của Bt đã đem lại khả năng bảo vệ hiệu quả chống

lại các loài gây hại được chọn và các thực vật chuyển gen biểu hiện các độc tố đó đã được thương mại hóa, cho phép nông dân giảm lượng sử dụng các nhân tố phòng trừ côn trùng hóa học.

Một họ protein diệt côn trùng khác, được tạo ra bởi các loài *Bacillus* trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng (các protein diệt côn trùng sinh dưỡng (vegetative insecticidal protein-Vip)), cũng đã được xác định. Các patent Mỹ số 5,877,012, 6,107,279 và 6,137,033 mô tả một nhóm protein diệt côn trùng mới gọi là Vip3. Các công bố khác, bao gồm WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546 và WO 99/57282, hiện cũng đã xác định được độ tương đồng của các protein thuộc nhóm Vip3 này. Các trình tự mã hóa Vip3 mã hóa cho các protein có trọng lượng xấp xỉ 88kDa, các protein này có hoạt tính diệt côn trùng chống lại một phổ rộng các loài gây hại cánh vảy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sâu ngài đêm đen (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu cắn gié vụ thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đục chồi cây thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*), sâu đục thân ở mía (SCB, *Diatraea saccharalis*), sâu đục thân ở ngô (LCB, *Elasmopalpus lignosellus*) và sâu đục bắp ngô (CEW, *Helicoverpa zed*) và khi được biểu hiện ở cây trồng chuyển gen, ví dụ, ở ngô (*Zea mays*), đem lại sự bảo vệ cây trồng khỏi sự ăn hại của côn trùng.

Các phương pháp biến nạp ADN thực vật hiện nay thường dẫn đến việc tích hợp ngẫu nhiên các gen chuyển như *vip3* vào một hệ gen thực vật chủ. Việc chèn ngẫu nhiên ADN được đưa vào này vào trong hệ gen của thực vật có thể gây chết nếu ADN ngoại lai được chèn vào và gây ra đột biến, ở một gen có vai trò đặc biệt quan trọng của vật chủ. Ngoài ra, ngay cả nếu việc chèn ngẫu nhiên không làm hỏng chức năng của gen trong tế bào chủ, việc biểu hiện của một gen ngoại lai được chèn vào có thể bị ảnh hưởng bởi “hiệu ứng vị trí” gây ra bởi ADN nằm xung quanh trong hệ gen. Trong một vài trường hợp, gen được chèn vào các vị trí mà tại đó hiệu ứng vị trí là đủ mạnh để cản trở sự tổng hợp một lượng hữu hiệu sản phẩm từ gen được đưa vào. Ví dụ, đã quan sát thấy ở thực vật, giữa các dòng được chọn một cách riêng lẻ, có thể có sự thay đổi diện rộng về mức biểu hiện của một gen lạ được đưa vào nhiễm sắc thể của thực vật. Cũng có thể có sự khác biệt ở kiểu biểu hiện về mặt không gian và thời gian, ví dụ, các sự khác biệt ở sự biểu hiện tương đối của một gen chuyển ở nhiều mô thực vật khác nhau, có thể không phù

hợp với các kiểu biểu hiện được mong đợi là có thể xảy ra từ các nhân tố điều hòa phiên mã có mặt trong cấu trúc gen được đưa vào. Ở các ví dụ khác, việc tạo ra quá mức sản phẩm của gen có tác dụng gây hại đối với tế bào. Do các vấn đề tiềm tàng nêu trên, phải tạo ra hàng trăm dòng khác nhau và sàng lọc các dòng đó để thu được một dòng đơn lẻ có mức độ và kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn dùng cho các mục đích thương mại là điều thường thấy. Tuy nhiên, một khi vị trí tồn tại mang tính thương mại trong hệ gen thực vật được xác định, đây sẽ là thuận lợi để hướng đích các gen quan tâm tới các vị trí không gây bất lợi.

Một số phương pháp để chèn có hướng đích một trình tự nucleotit quan tâm vào vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể trong một tế bào thực vật đã được mô tả. Các hệ thống tái tổ hợp đặc hiệu vị trí đã được xác định ở một vài sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn bậc thấp. Các hệ thống này thường bao gồm có một hoặc nhiều protein nhận biết được hai bản sao của một trình tự nucleotit đặc hiệu, cắt và nối các trình tự nucleotit này và do đó sẽ tạo ra sự trao đổi chính xác và đặc hiệu vị trí của thông tin di truyền. Một vài enzym tái tổ hợp đặc hiệu vị trí đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chúng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ví dụ, hệ thống thực khuẩn thể Pl Cre/lox (Austin et al. (1981) Cell 25: 729-736), hệ thống enzym tái tổ hợp R/RS có nguồn gốc từ plasmit pSR1 của nấm men *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), hệ thống Gin/gix của thực khuẩn thể Mu (Maeser and Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176), hệ thống tái enzym tổ hợp FLP/FRT từ plasmit 2.mu.m của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (Broach et al. (1982) Cell 29: 227-234), enzym tái tổ hợp Int có nguồn gốc từ thực khuẩn thể Lambda (Landy (1989) Annu. Rev. Biochem. 58: 912-949; Landy (1993) Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 699-707; Lorbach et al. (2000) J. Mol. Biol. 296: 1175-1181; và WO 01/16345). Một phương pháp hướng đích đặc hiệu vị trí có hiệu quả cụ thể, được bộc lộ trong US 2006/0130179, sử dụng sự tái tổ hợp qua trung gian enzym tích hợp lambda. Phương pháp này bao gồm việc đưa vào tế bào thực vật một trình tự nucleotit đích chứa vị trí nhận biết enzym tích hợp thứ nhất; đưa vào tế bào thực vật một trình tự nucleotit cho, chứa vị trí nhận biết enzym tích hợp thứ hai; và đưa vào tế bào thực vật một enzym tích hợp hoặc một phức hợp enzym tích hợp. Một phương pháp hướng đích đặc hiệu có vị trí hiệu quả khác được bộc lộ trong US2006/0253918, sử dụng

phương pháp tái tổ hợp tương đồng để tích hợp một hoặc nhiều gen (sự tích lũy gen) vào các vị trí đặc hiệu trong hệ gen.

Một dòng có gen chuyển được biểu hiện với kiểu và mức độ như mong muốn sẽ có ích trong việc đưa một gen chuyển vào hệ vật chất di truyền khác bằng cách lai chéo dòng hữu tính sử dụng các phương pháp lai giống truyền thống. Thế hệ con lai vẫn duy trì các đặc tính biểu hiện gen chuyển của thể biến nạp ban đầu. Phương pháp này được sử dụng nhằm đảm bảo chắc chắn sự biểu hiện gen ở một số giống thích nghi với các điều kiện sinh trưởng bản địa. Đây cũng là thuận lợi để có thể phát hiện sự có mặt của một dòng cụ thể nhằm xác định liệu thế hệ con lai có mang gen chuyển quan tâm hay không. Ngoài ra, phương pháp phát hiện một dòng cụ thể cũng có ích cho, ví dụ, việc tuân theo các quy định cần có sự phê chuẩn trước khi đưa ra thị trường và dán nhãn thực phẩm có nguồn gốc từ các thực vật tái tổ hợp. Có thể phát hiện sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp phát hiện axit nucleic phổ biến bất kỳ, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp khuếch đại nhiệt (phản ứng chuỗi xúc tác bởi enzym polymeraza - polymerase chain reaction (PCR)) sử dụng các đoạn mồi polynucleotit hoặc phương pháp lai ADN bằng các mẫu dò axit nucleic. Điển hình như, để đơn giản và đồng bộ các hóa chất và phương pháp sử dụng để phát hiện một cấu trúc ADN cụ thể đã được dùng để biến nạp ở nhiều giống thực vật khác nhau, các phương pháp phát hiện này thường tập trung vào các yếu tố di truyền được sử dụng thường xuyên, ví dụ, các trình tự khởi đầu phiên mã, các trình tự kết thúc phiên mã và các gen chỉ thị, vì với nhiều cấu trúc ADN, vùng trình tự mang mã có thể thay đổi. Kết quả là, các phương pháp này có thể không hữu dụng để phân biệt giữa các cấu trúc chỉ khác nhau về phần trình tự mang mã. Ngoài ra, các phương pháp này có thể không hữu dụng để phân biệt các dòng khác nhau, đặc biệt là các dòng được tạo ra bằng cách sử dụng cùng một cấu trúc ADN trừ khi trình tự ADN nhiễm sắc thể gần kề với ADN lạ chèn vào (ADN bên cạnh) được biết.

Với các lí do nêu trên, cần phải có các dòng ngô chuyển gen kháng côn trùng chứa các trình tự axit nucleic mới – duy nhất đối với dòng ngô chuyển gen, hữu ích cho việc phát hiện dòng ngô chuyển gen và nhận biết các axit nucleic từ dòng ngô chuyển gen này trong mẫu sinh học, cũng như các bộ (kit) chứa đầy đủ các hóa chất cần thiết để nhận biết các axit nucleic này trong mẫu sinh học. Việc cung cấp các vị trí đích đặc hiệu trong hệ

gen ngô để cho phép hướng đích và kiểm soát việc chèn các trình tự nucleotit cần tích hợp vào hệ gen ngô là một mong muốn xa hơn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất dòng ngô (*Zea mays*) được biến nạp, có số hiệu lưu giữ MIR162, có chứa kiểu gen chuyển mới, chứa trình tự mang mã *vip3Aa20* – là duy nhất đối với dòng MIR162. Trình tự mang mã *vip3Aa20* này mã hóa protein diệt côn trùng *Vip3Aa20*, đem lại tính kháng côn trùng cho các cây ngô MIR162. Dòng MIR162 này cũng mang trình tự mang mã *pmi* mã hóa protein PMI giúp cho các tế bào ngô có khả năng sử dụng manozơ làm nguồn cacbon. Bên cạnh trình tự gen *vip3A20*, sáng chế cũng đề xuất các đoạn axit nucleic khác và là duy nhất với MIR162. Sáng chế cũng đề xuất các cây ngô chuyển gen có các axit nucleic – duy nhất đối với MIR162, hạt từ cây ngô chuyển gen này và phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen các axit nucleic duy nhất theo sáng chế bằng cách lai chéo cây ngô có các trình tự axit nucleic thuộc dòng MIR162 với cây cùng dòng hoặc với một cây khác dòng khác về kiểu gen. Mẫu hạt và cây ngô sinh trưởng từ hạt này, chứa axit nucleic duy nhất đối với dòng MIR162, đã được nộp lưu tại American Type Culture Collection (ATCC) với số hiệu lưu giữ PTA-8166. Các cây ngô chuyển gen theo sáng chế có thể có hầu như tất cả các đặc tính về sinh lý và hình thái của các cây ngô không chuyển gen đồng gen cộng thêm các đặc tính có được do kiểu gen mới theo sáng chế mang lại. Các mẫu sinh học và chiết phẩm từ các cây, mô và hạt của ngô MIR162 cũng được đề xuất. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm và phương pháp phát hiện sự có mặt của các axit nucleic duy nhất đối với dòng MIR162 trong mẫu sinh học dựa trên trình tự ADN của các cát xét biểu hiện tái tổ hợp được chèn vào hệ gen ngô, đã tạo ra dòng ngô MIR162 này và trình tự ADN hệ gen gần kề vị trí chèn. Sáng chế cũng đề xuất vị trí đích để chèn gen có hiệu quả trên nhiễm sắc thể của ngô hữu dụng cho việc chèn gen quan tâm vào vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể và phương pháp cải biến hệ gen ngô bằng cách chèn các axit nucleic ngoại lai tại vị trí chèn đã được bộc lộ hoặc ở vùng phụ cận của vị trí chèn được bộc lộ. Dòng MIR162 cũng có thể được xác định bằng cách phân tích mức biểu hiện của các protein *Vip3Aa20* và protein PMI cũng như bằng cách thử nghiệm hiệu quả chống lại côn trùng cánh vảy gây hại ở dòng MIR162. Sáng chế cũng đề xuất phương

pháp tạo cây ngô chuyển gen có tính kháng phổ rộng hơn đối với các loài côn trùng có hại bằng cách kết hợp tính trạng kháng côn trùng của protein Vip3Aa20 với các tính trạng kháng côn trùng có được bởi các protein khác ngoại trừ Vip3Aa20.

Các khía cạnh nêu trên và các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn nhờ các mô tả chi tiết sau.

Mô tả các trình tự trong bảng trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự mã hóa *Vip3Aa20* ở MIR162.

SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin của *Vip3Aa20*.

SEQ ID NO: 3 là trình tự của plasmit pNOV1300.

SEQ ID No: 4-12 là trình tự các đoạn môi và mẫu dò hữu dụng trong thử nghiệm TAQMAN.

SEQ ID NO: 13 là trình tự mẫu dò gen *vip3Aa20*.

SEQ ID NO: 14 là trình tự mẫu dò gen *pmi*.

SEQ ID No: 15-37 là trình tự các đoạn môi có ích theo sáng chế.

SEQ ID No: 38 là trình tự đoạn khuếch đại của *vip3Aa20*.

SEQ ID No: 39-40 là trình tự các đoạn môi có ích theo sáng chế.

SEQ ID No: 41 là trình tự các đoạn khuếch đại của CJ 134/179 đầu 5'.

SEQ ID No: 42-43 là trình tự các đoạn môi có ích theo sáng chế.

SEQ ID NO: 44 là đoạn khuếch đại của *vip3Aa20* đầu 3'.

SEQ ID NO: 45 là vùng liên kết gen-đoạn chèn đầu 5'.

SEQ ID NO: 46 là trình tự ADN vùng biên ứng với đoạn chèn đầu 5'.

SEQ ID NO: 47 là vùng liên kết gen-đoạn chèn đầu 3'.

SEQ ID NO: 48 là trình tự ADN vùng biên của ngô ứng với đoạn chèn đầu 3'.

SEQ ID NO: 49 là trình tự đoạn chèn MIR162 và vùng biên.

SEQ ID Nos. 50-54 là trình tự các đoạn môi hữu dụng theo sáng chế.

SEQ ID NO: 55 là đoạn khuếch đại PCR đầu 5'.

SEQ ID No. 56-58 là trình tự các đoạn môi hữu dụng theo sáng chế.

SEQ ID NO: 59 là đoạn khuếch đại PCR đầu 3'.

SEQ ID No. 60-105 là trình tự các đoạn môi hữu dụng theo sáng chế.

SEQ ID NO: 106 là trình tự vùng ADN trên nhiễm sắc thể số 5 ở ngô có mang vị trí đích trên nhiễm sắc thể đã được bộc lộ.

SEQ ID NO: 107 là trình tự ADN ở ngô bị thay thế do chèn ADN ngoại lai ở MIR162.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa và phương pháp nêu dưới đây dùng để xác định rõ hơn sáng chế và để hướng dẫn các người có hiểu biết trung bình thực hiện sáng chế. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ dùng ở đây được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có liên quan. Các định nghĩa của các thuật ngữ thông thường trong sinh học phân tử có thể được tìm ở tài liệu: Rieger và cộng sự, Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1994. Cách đặt tên bazơ và axit amin của ADN theo 37 C.F.R. § 1.822 như được sử dụng ở đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khuếch đại" mang nghĩa tạo ra nhiều bản sao của một phân tử axit nucleic hay nhiều bản sao bổ sung của phân tử axit nucleic bằng cách sử dụng ít nhất một phân tử axit nucleic khuôn. Các hệ thống khuếch đại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ thống phản ứng chuỗi xúc tác bởi enzym polymeraza (PCR), hệ thống phản ứng chuỗi xúc tác bởi enzym ligaza (LCR), sự khuếch đại dựa trên trình tự axit nucleic (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario), các hệ thống enzym Q-Beta Replicaza, hệ thống khuếch đại dựa trên phiên mã (TAS) và khuếch đại thay thế mạch (SDA). Xem thêm, ví dụ Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, D. H. Persing và cộng sự, Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Sản phẩm của sự khuếch đại gọi là đoạn khuếch đại.

Một "trình tự mã hóa" là một trình tự axit nucleic được phiên mã thành ARN như mARN, rARN, tARN, snARN, sense ARN hoặc antisense ARN. Tốt hơn, ARN sau đó được dịch mã trong cơ thể sinh vật để tạo ra một protein.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ "ngô" có nghĩa là *Zea mays* hay ngô và bao gồm tất cả các giống thực vật có thể thụ phấn với ngô, bao gồm cả các loài ngô trong tự nhiên.

"Kit phát hiện" như được sử dụng ở đây có nghĩa là một bộ các thành phần hữu dụng trong việc phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của ADN duy nhất đối với dòng MIR162 trong mẫu, trong đó, kit này gồm có các mẫu dò và/hoặc các đoạn môi axit nucleic theo sáng chế, chúng lai đặc hiệu ở các điều kiện chuẩn xác cao với trình tự ADN

đích và các chất liệu khác cần thiết để có thể thực hiện phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “dòng” chuyển gen được biết tới là một thực vật tái tổ hợp được tạo ra bởi quá trình chuyển gen và sinh sản từ một tế bào hay mô thực vật với một ADN ngoại lai, ví dụ, một cát xét biểu hiện có chứa gen quan tâm. Thuật ngữ “dòng” có nghĩa là dạng chuyển gen nguyên gốc và/ hoặc các thế hệ sau của dạng chuyển có ADN ngoại lai. Thuật ngữ “dòng” cũng có nghĩa là thế hệ sau có được nhờ lai chéo giữa dạng chuyển gen và một dòng ngô khác. Thậm chí sau khi lai ngược với dòng bố mẹ, ADN được chèn vào và ADN vùng biên từ dòng bố mẹ chuyển gen xuất hiện ở thế hệ tiếp sau, trên cùng một vùng nhiễm sắc thể. Thuật ngữ “dòng” cũng có nghĩa ADN từ dạng chuyển gen nguyên gốc có mang ADN được chèn và trình tự hệ gen vùng biên ngay cạnh ADN chèn vào được cho là sẽ chuyển qua cho một thế hệ sau. Thế hệ sau này nhận ADN chèn bao gồm gen chuyển quan tâm là kết quả của lai hữu tính một dòng bố mẹ có mang ADN chèn vào (ví dụ, dạng chuyển gen nguyên gốc và các thế hệ sau có được do tự thụ phấn) và một dòng bố mẹ không chứa ADN chèn vào. Thông thường, việc chuyển gen của mô thực vật tạo ra nhiều dòng, mỗi dòng có cấu trúc ADN được chèn ở các vùng khác nhau trong hệ gen của một tế bào thực vật. Dựa vào việc biểu hiện gen chuyển hay các đặc tính mong muốn khác, một dòng đơn lẻ sẽ được chọn. Do vậy, “dòng MIR162”, “MIR162” hay “dòng mang MIR162” có thể sử dụng thay thế cho nhau.

Cây ngô MIR162 kháng côn trùng có thể được tạo ra bằng trước tiên lai hữu tính cây bố mẹ thứ nhất bao gồm cây ngô phát triển từ cây ngô MIR162 chuyển gen, ví dụ như cây ngô MIR162 phát triển từ hạt lưu tại ATCC với số đăng nhập No. PTA-6188 và thế hệ sau của chúng xuất phát từ dạng chuyển gen có các cát xét biểu hiện của các phương án theo sáng chế mang lại tính kháng côn trùng và cây ngô bố mẹ thứ hai không kháng côn trùng, bằng cách này tạo ra một lượng lớn các cây con thế hệ thứ nhất; và sau đó chọn lọc cây thế hệ thứ nhất có kháng côn trùng; và tự thụ phấn cây con thế hệ thứ nhất này, bằng cách này tạo ra một lượng lớn cây con thế hệ thứ hai; và sau đó chọn từ các cây con thế hệ thứ hai này cây kháng côn trùng. Các bước này còn có thể bao gồm bước lai ngược của các cây con kháng côn trùng thế hệ thứ nhất hay các cây con kháng côn trùng thế hệ

thứ hai với cây ngô bố mẹ thứ hai hoặc cây ngô bố mẹ thế hệ thứ ba, bằng cách đó tạo ra cây ngô kháng côn trùng.

"Cát xét biểu hiện" được sử dụng ở đây có nghĩa là một phân tử axit nucleic có khả năng biểu hiện trực tiếp một trình tự nucleotit riêng lẻ trong một tế bào chủ phù hợp, gồm có một vùng promoto liên kết linh hoạt với trình tự nucleotit quan tâm, và trình tự này cũng được liên kết linh hoạt với các tín hiệu kết thúc. Cát xét biểu hiện cũng gồm các trình tự cần thiết cho việc dịch mã đúng các trình tự nucleotit. Cát xét biểu hiện cũng có thể gồm các trình tự không cần thiết cho việc biểu hiện trực tiếp một trình tự nucleotit quan tâm nhưng chúng tồn tại để tạo ra các vị trí cắt giới hạn thuận lợi dùng cho việc loại bỏ cát xét biểu hiện từ một vector biểu hiện. Cát xét biểu hiện mang trình tự nucleotit quan tâm có thể là khảm, có nghĩa là ít nhất một trong các thành phần của nó là dị hợp (ngoại lai) với ít nhất một trong các phần khác của nó. Cát xét biểu hiện cũng có thể là một tổ hợp xuất hiện tự nhiên nhưng thu được trong một dạng tái tổ hợp có ích cho việc biểu hiện ngoại lai. Tuy nhiên, thường thì, cát xét biểu hiện có tính ngoại lai đối với vật chủ, có nghĩa là trình tự axit nucleic riêng biệt của cát xét biểu hiện không xuất hiện tự nhiên trong tế bào vật chủ và phải được đưa vào tế bào vật chủ hoặc một dạng gốc của tế bào chủ đó bằng quá trình chuyển gen đã được biết đến. Sự biểu hiện của trình tự nucleotit trong cát xét biểu hiện có thể được điều khiển bởi một promoto cơ định hay một promoto cảm ứng, bắt đầu quá trình phiên mã chỉ khi tế bào vật chủ tiếp xúc với một số yếu tố kích thích bên ngoài đặc biệt. Trong trường hợp một cơ thể đa bào, ví dụ như một thực vật, promoto cũng có thể là đặc hiệu đối với từng loại mô hoặc cơ quan hoặc giai đoạn phát triển. Một cát xét biểu hiện hoặc một đoạn của chúng, cũng có thể được gọi là "trình tự được chèn" hay "trình tự chèn" khi được biến nạp vào cây.

Thuật ngữ "gen" được định nghĩa là vùng nằm trên hệ gen, bên cạnh trình tự mã hóa đã nói ở trên, có thể gồm có các phần khác, vùng điều hòa chính, các trình tự axit nucleic chịu trách nhiệm cho việc điều khiển sự biểu hiện, gồm phiên mã và dịch mã, của phần mã hóa. Một gen cũng có thể bao gồm các trình tự đầu 5' và 3' không dịch mã và các trình tự kết thúc. Các nhân tố khác, như các intron, có thể tồn tại.

Thuật ngữ "gen quan tâm" có nghĩa là gen, khi được chuyển vào cây, đem lại cho cây đặc tính mong muốn như kháng chất kháng sinh, kháng virus, kháng côn trùng, kháng

bệnh, hay kháng lại các loài động vật gây hại, chịu được thuốc diệt cỏ, làm tăng giá trị dinh dưỡng, tăng hiệu suất cho một quá trình công nghiệp hay thay đổi khả năng sinh sản.

Thuật ngữ "kiểu gen" được sử dụng trong tài liệu này có nghĩa là vật liệu di truyền được thừa hưởng từ thế hệ cây ngô bố mẹ, tất cả chúng không nhất thiết được biểu hiện ở các thế hệ con cháu. Kiểu gen MIR162 là dạng vật chất di truyền ngoại lai, được chuyển vào hệ gen của cây cũng như vùng vật chất di truyền biên của trình tự được chèn vào.

Một trình tự axit nucleic “ngoại lai” là một trình tự axit nucleic không liên quan một cách tự nhiên với tế bào vật chủ mà nó được đưa vào, bao gồm nhiều bản sao xuất hiện không tự nhiên của một trình tự axit nucleic xuất hiện tự nhiên.

Một trình tự axit nucleic “tương đồng” là một trình tự axit nucleic liên quan tự nhiên với một tế bào chủ mà nó được đưa vào.

Thuật ngữ “liên kết linh hoạt” là sự liên kết của các trình tự axit nucleic trên một đoạn axit nucleic đơn, do đó chức năng của trình tự này tác động đến chức năng của trình tự khác. Ví dụ, một promoter được liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa hay RNA có chức năng khi nó có khả năng tác động đến việc biểu hiện của trình tự mã hóa hay ARN chức năng khi chúng có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa đó hay ARN chức năng (nghĩa là trình tự mã hóa hay ARN chức năng được điều hòa phiên mã bởi promoter). Các trình tự mã hóa ở cả chiều thuận hoặc nghịch có thể được liên kết linh hoạt với các trình tự điều hòa.

Thuật ngữ "các đoạn nối" được sử dụng trong tài liệu này là các axit nucleic đã được phân lập, được chèn vào một mạch ADN đích theo nguyên tắc bổ sung do sự lai axit nucleic để tạo ra một thể lai giữa đoạn nối và mạch ADN đích và sau đó được kéo dài theo mạch ADN đích bởi một loại enzyme polymeraza, như ADN polymeraza. Các cặp đoạn nối hay các bộ đoạn nối có thể được sử dụng để khuếch đại một phân tử axit nucleic, ví dụ, nhờ phản ứng chuỗi xúc tác bởi enzyme polymeraza (PCR) hay các phương pháp khuếch đại axit nucleic truyền thống khác.

Thuật ngữ “mẫu dò” là một axit nucleic đã được phân lập, được chèn với một phân tử đánh dấu truyền thống có thể dò được, như đồng vị phóng xạ, phốt pho, các chất huỳnh quang hóa học hoặc enzyme. Mẫu dò này bắt cặp bổ sung với một mạch axit nucleic đích, trong trường hợp của sàng chế, nó bắt cặp với một mạch ADN hệ gen của dòng ngô

MIR162. ADN của MIR162 có thể từ cây ngô hoặc một mẫu có ADN từ MIR162. Các mẫu dò, theo sáng chế, không chỉ gồm axit deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà cả polyamit và các vật liệu dò khác, bám đặc hiệu với trình tự ADN đích và có thể sử dụng để phát hiện sự có mặt của trình tự ADN đích.

Các đoạn mồi và mẫu dò thường có độ dài khoảng 10 đến 15 nucleotit hoặc hơn. Các đoạn mồi và mẫu dò cũng có thể có ít nhất 20 nucleotit hoặc hơn hoặc ít nhất 25 nucleotit hoặc hơn hoặc ít nhất 30 nucleotit hoặc hơn. Các đoạn mồi và mẫu dò này bám đặc hiệu với trình tự đích ở các điều kiện lai chuẩn xác cao. Các đoạn mồi và mẫu dò theo sáng chế có thể có trình tự hoàn toàn bổ sung với trình tự đích, mặc dù mẫu dò khác so với trình tự đích và nó đảm bảo khả năng lai với các trình tự đích, có thể được thiết kế bởi các phương pháp truyền thống.

Như đã được sử dụng ở đây "kết hợp" gen hoặc tính trạng có nghĩa là sự kết hợp các tính trạng mong muốn vào một dòng chuyển gen. Các nhà gây giống cây kết hợp các tính trạng chuyển gen bằng việc sử dụng phép lai chéo giữa các bố mẹ trong đó mỗi bố mẹ có một tính trạng mong muốn và sau đó xác định đời con có cả hai tính trạng mong muốn này. Một cách khác để kết hợp các gen là việc chuyển hai hoặc nhiều gen vào trong nhân tế bào của cây ở cùng thời điểm chuyển gen. Một cách nữa để kết hợp các gen là việc tiếp tục chuyển gen mong muốn cho cây đã chuyển gen. Ví dụ, việc kết hợp gen có thể được sử dụng để kết hợp hai tính trạng kháng côn trùng khác nhau, một tính trạng kháng côn trùng và một tính trạng kháng bệnh hoặc một tính trạng kháng thuốc diệt cỏ. Việc sử dụng các gen chỉ thị chọn lọc kèm theo gen quan tâm có thể coi là sự kết hợp gen.

"Các điều kiện chuẩn xác" hoặc "các điều kiện lai chuẩn xác" bao gồm các điều kiện, tại đó một mẫu dò sẽ lai với trình tự đích của nó và đạt được mức độ nhận biết lớn hơn so với các trình tự khác. Các điều kiện chuẩn xác phụ thuộc vào trình tự đích và sẽ thay đổi tùy vào cấu trúc của polynucleotit. Bằng cách kiểm soát độ chuẩn xác của các điều kiện lai và/hoặc rửa, các trình tự đích có thể được phát hiện với 100% bổ sung với mẫu dò (mẫu dò đồng hợp). Các điều kiện chuẩn xác còn có thể được điều chỉnh để cho phép có một vài điểm không phù hợp trong các trình tự sao cho mức độ tương đồng thấp hơn được phát hiện (mẫu dò ngoại lai). Các trình tự dài hơn lai đặc hiệu ở các nhiệt độ

cao hơn. Hướng dẫn sâu hơn cho phương pháp lai các axit nucleic có thể tìm ở tài liệu: Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Phần I, Chương 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier: New York; và *Current Protocols in Molecular Biology*, Chương 2, Ausubel et al., Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience: New York (1995) và Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (5th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Tính đặc hiệu là đặt trung cho chức năng của quá trình rửa sau lai, các yếu tố then chốt là lực ion và nhiệt độ của dung dịch rửa cuối cùng. Nói chung, điều kiện rửa và lai chuẩn xác cao được chọn thấp hơn khoảng 5°C so với điểm nóng chảy nhiệt (T_m) đối với trình tự đặc hiệu ở điều kiện độ pH và lực ion xác định. T_m là nhiệt độ (ở điều kiện độ pH và lực ion xác định) mà tại đó 50% trình tự đích lai với một mẫu dò phù hợp hoàn toàn. Điển hình, ở các điều kiện chuẩn xác cao, một mẫu dò sẽ lai với trình tự đích của nó mà không lai với các trình tự khác.

Một ví dụ về các điều kiện lai chuẩn xác cao trong lai các axit nucleic bổ sung gồm có hơn 100 gốc bổ sung trên màng trong phép lai Southern hoặc Northern blot là 50% formamit với 1mg heparin ở 42°C , quá trình lai được diễn ra qua đêm. Một ví dụ về các điều kiện rửa chuẩn xác rất cao là NaCl 0,15 M ở 72°C trong khoảng 15 phút. Một ví dụ về các điều kiện rửa chuẩn xác cao là 0,2x SSC rửa ở 65°C trong 15 phút (xem, Sambrook, *infra*, để biết về chất đệm SSC).

Các điều kiện lai chuẩn cho sáng chế bao gồm quá trình lai ở SDS 7%, NaPO_4 0,25M độ pH 7,2 ở 67°C qua đêm, tiếp theo là hai lần rửa trong SDS 5%, NaPO_4 0,20M độ pH 7,2 ở 65°C trong 30 phút mỗi lần và hai lần rửa trong SDS 1%, 0,20M NaPO_4 độ pH 7,2 ở 65°C trong 30 mỗi lần. Một lần rửa chuẩn chuẩn xác ở mức độ trung bình cho một phức kép, ví dụ hơn 100 nucleotit, là 1x SSC ở 45°C trong 15 phút. Một lần rửa chuẩn chuẩn xác ở mức độ trung bình cho một phức kép, ví dụ hơn 100 nucleotit, là 4-6x SSC ở 40°C trong 15 phút.

Đối với các mẫu dò khoảng 10 tới 50 nucleotit, các điều kiện chuẩn xác cao liên quan đặc thù với nồng độ muối thấp hơn khoảng 1,0M Na ion, điển hình khoảng từ 0,01

đến 1,0M Na ion (hoặc các muối khác) ở độ pH 7,0 tới 8.3 và nhiệt độ tiêu biểu ít nhất ở khoảng 30°C. Các điều kiện chuẩn xác cao cũng có thể đạt được bằng cách bổ sung các chất chống ổn định như formamit. Nhìn chung, một tỉ lệ giữa tín hiệu và nhiễu là 2x (hoặc cao hơn thế) quan sát thấy ở một mẫu dò không liên quan trong phép lai nào đó biểu thị sự phát hiện của quá trình lai đặc hiệu. Các axit nucleic không lai với nhau trong các điều kiện chuẩn xác cao về cơ bản vẫn đồng nhất, nếu như các protein mà chúng mã hóa về cơ bản là đồng nhất. Điều này xảy ra, ví dụ khi một bản sao một axit nucleic được tạo ra bằng cách sử dụng một cách tối đa sự thoái hóa codon mà mã di truyền cho phép.

Sau đây là bộ các điều kiện lai/rửa mẫu làm ví dụ minh họa có thể được sử dụng để lai các trình tự nucleotit mà đồng nhất về cơ bản với các trình tự nucleotit chuẩn theo sáng chế: tốt hơn nếu một trình tự nucleotit chuẩn lai với một trình tự nucleotit chuẩn trong natri dodecyl sulfat 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C và rửa trong 2X SSC, SDS 0,1% ở 50°C, kết quả tốt hơn ở natri dodecyl sulfat 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C và rửa trong 1X SSC, SDS 0,1% ở 50°C, kết quả tốt hơn vẫn ở natri dodecyl sulfat 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C và rửa trong 0,5X SSC, SDS 0,1% ở 50°C, hoàn hảo ở natri dodecyl sulfat 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C và rửa trong 0,1X SSC, SDS 0,1% ở 50°C, hoàn hảo hơn ở natri dodecyl sulfat 7% (SDS), NaPO₄ 0,5M, EDTA 1mM ở 50°C và rửa trong 0,1X SSC, SDS 0,1% ở 65°C. Các trình tự theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng tất cả các điều kiện trên. Với mục đích làm rõ sáng chế, các điều kiện chuẩn xác cao được sử dụng.

Thuật ngữ "biến nạp" là một quá trình đưa axit nucleic ngoại lai vào một tế bào chủ hay một sinh vật. Cụ thể, "biến nạp" có nghĩa là quá trình tích hợp một cách ổn định một phân tử ADN vào hệ gen của sinh vật quan tâm.

Thuật ngữ "được biến nạp/chuyển gen/tái tổ hợp" có nghĩa là một sinh vật chủ như vi khuẩn hay cây, trong đó, axit nucleic ngoại lai đã được đưa vào. Phân tử axit nucleic được tích hợp ổn định vào hệ gen của vật chủ hoặc phân tử axit nucleic này có thể tồn tại ở dạng không nằm trên nhiễm sắc thể. Dạng phân tử không thuộc nhiễm sắc thể này có thể tự nhân bản. Tế bào, mô hoặc cây được biến nạp được hiểu là bao gồm không chỉ sản phẩm cuối cùng của quá trình biến nạp mà còn thế hệ con cháu được chuyển gen của chúng. Một vật chủ "không được biến nạp", "không chuyển gen" hoặc "không tái tổ hợp"

được xem là một sinh vật hoang dại, ví dụ, một vi khuẩn hay cây, không chứa phân tử axit nucleic ngoại lai. Như đã sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “chuyển gen” có nghĩa là cây, tế bào thực vật hoặc nhiều tế bào thực vật ở dạng có cấu trúc hoặc không có cấu trúc được tích hợp, bằng các kỹ thuật di truyền và chèn gen đã được biết đến rộng rãi, một trình tự axit nucleic biểu hiện một gen quan tâm vào trong hệ gen cây, điển hình là vào một nhiễm sắc thể trong nhân tế bào, ti thể hoặc các bào quan khác có chứa thể nhiễm sắc, tại vị trí khác hoặc với số bản sao lớn hơn, bình thường trong thực vật hoặc tế bào tự vật tự nhiên. Các cây được chuyển gen là kết quả của thao tác và quá trình chèn các trình tự axit nucleic đó, trái ngược với các đột biến xuất hiện tự nhiên, để tạo ra cây xuất hiện một cách không tự nhiên hoặc cây với một kiểu gen xuất hiện không tự nhiên. Các kỹ thuật sử dụng cho quá trình biến nạp ở thực vật và tế bào thực vật đã được biết đến rộng rãi và có thể gồm, ví dụ như các phương pháp xung điện, vi tiêm, biến nạp sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium* làm trung gian và biến nạp nhờ vi hạt.

Như đã sử dụng ở đây, thuật ngữ “duy nhất” đối với MIR162 có nghĩa đây là đặc tính đặc thù của MIR162. Do đó, các axit nucleic duy nhất ở dòng MIR162 không tìm thấy ở các cây ngô không thuộc dòng MIR162.

Nhóm protein "Vip3" bao gồm, ví dụ, Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ac, Vip3Ad, Vip3Ae, Vip3Af, Vip3Ag, Vip3Ba và Vip3Bb và các protein tương đồng với nó. "Tương đồng" có nghĩa protein hay trình tự polypeptit đó có một mối liên quan xác định với các protein khác thuộc nhóm protein Vip3. “Vip3Aa20” là một protein tương đồng với nhóm Vip3, duy nhất có ở dòng MIR162. Protein này được tạo ra bằng cách gây đột biến tự phát trên gen *vip3Aa19* đã được tối ưu hóa cho ngô, nằm trong pNOV1300 (SEQ ID NO:3) trong quá trình biến nạp thực vật.

Sáng chế đề cập tới dòng ngô đã được cải tạo vật liệu di truyền để tạo protein Vip3Aa20 phòng trừ côn trùng và enzym phosphomannoza isomerase (PMI) cho phép cây sử dụng mannoza làm nguồn cacbon. Sáng chế cũng đặc biệt mô tả dòng ngô chuyển gen được định rõ là MIR162 mang kiểu gen mới, cũng như các chế phẩm và phương pháp nhận biết các axit nucleic là duy nhất đối với MIR162 trong mẫu sinh học. Sáng chế còn mô tả các cây ngô có kiểu gen MIR162, hạt chuyển gen từ các cây ngô này và các phương pháp để tạo ra cây ngô có kiểu gen MIR162 bằng phương pháp lai chéo dòng ngô mang

kiểu gen MIR162 với chính nó hoặc với dòng ngô khác. Các cây ngô có kiểu gen MIR162 theo sáng chế có ích trong phòng trừ các loại côn trùng gây hại cánh vảy, gồm có, nhưng không chỉ giới hạn ở, sâu xám (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu cắn gié vụ thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đục chồi cây thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*), sâu đục thân ở mía (SCB, *Diatraea saccharalis*), sâu đục thân ở ngô (LCB, *Elasmopalpus lignosellus*), sâu đục bắp ngô (CEW, *Helicoverpa zea*) và sâu cắn hại đậu tây (WBCW, *Striacosta albicosta*). Sáng chế cũng mô tả một phương pháp để bảo vệ ngô chuyển gen khỏi sự ăn hại của côn trùng bằng cách kết hợp tính trạng kháng côn trùng của MIR162 với một tính trạng kháng sâu khác trên cùng cây chuyển gen, kết quả tạo ra cây ngô được bảo vệ khỏi sự ăn hại của côn trùng ở mức độ lớn hơn khi các tính trạng đó đứng riêng lẻ.

Theo một phương án, sáng chế bao hàm một phân tử axit nucleic phân lập được chứa một trình tự nucleotit duy nhất với dòng MIR162.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm một phân tử nucleic axit giúp liên kết một phân tử ADN ngoại lai được chèn vào hệ gen của MIR 162 với ADN hệ gen trong MIR 162 chứa ít nhất 10 hoặc hơn (ví dụ 15, 20, 25, 50 hoặc hơn) các nucleotit liên tiếp nhau của phân tử ADN ngoại lai và ít nhất 10 hoặc hơn (ví dụ 15, 20, 25, 50 hoặc hơn) các nucleotit liên tiếp nhau của ADN hệ gen nằm ở biên của điểm chèn phân tử ADN ngoại lai. Ngoài ra, sáng chế còn bao gồm các trình tự nucleotit chứa 10 hoặc hơn 10 nucleotit của trình tự đoạn chèn liên tiếp nhau từ dòng MIR 162 và ít nhất một nucleotit của ADN ở vùng biên từ dòng MIR 162. Các trình tự nucleotit này là duy nhất và là chuẩn đoán cho dòng MIR162 liên hệ trình tự chèn. Quá trình khuếch đại hoặc lai axit nucleic của ADN hệ gen của dòng MIR 162 sẽ tạo ra một đoạn khuếch đại chứa các trình tự duy nhất này và là chuẩn đoán cho dòng MIR162. Ở một khía cạnh khác của phương án này, trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 và các trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm phân tử axit nucleic phân lập được chứa một trình tự nucleotit có ít nhất một trình tự liên kết của dòng MIR 162, trong đó, một trình tự liên kết kéo dài từ đoạn nối giữa cát xét biểu hiện ngoại lai được chèn vào hệ gen của ngô và ADN từ hệ gen ngô nằm cạnh vị trí chèn và là chuẩn đoán cho dòng. Ở

một khía cạnh khác của phương án này, trình tự đoạn nối được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 và các trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm phân tử axit nucleic phân lập được liên kết một phân tử ADN ngoại lai với hệ gen ngô dòng MIR 162 chứa một trình tự từ khoảng 11 đến khoảng 20 nucleotit liên tiếp được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 và các trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm phân tử axit nucleic phân lập được chứa một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 và các trình tự bổ sung của nó. Ở một khía cạnh khác của phương án này, phân tử axit nucleic phân lập được nằm trong hạt ngô được lưu tại American Type Culture Collection với số hiệu PTA-8166 hoặc trong các cây được trồng từ các hạt này.

Theo một phương án của sáng chế, sản phẩm khuếch đại chứa một trình tự nucleotit duy nhất với dòng MIR162 được đề xuất. Theo một khía cạnh khác của phương án này, trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 và các trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm các đoạn môi trình tự biên nhằm phát hiện dòng MIR162. Các đoạn môi trình tự biên này chứa một trình tự nucleotit ít nhất 10 đến 15 nucleotit kề nhau từ trình tự biên đầu 5' hoặc 3'. Theo một khía cạnh của phương án này, các nucleotit liền nhau này được chọn từ các nucleotit 1-1088 của SEQ ID NO: 49 (ở đây được mặc định là trình tự vùng biên 5') hoặc các trình tự bổ sung của nó. Theo một khía cạnh khác của phương án này, các đoạn môi trình tự vùng biên 5' được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự sau SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 68-80 và các trình tự bổ sung của nó. Theo một khía cạnh khác của phương án này, các nucleotit liền nhau được chọn từ các nucleotit 9391 đến 10579 (bao gồm) của trình tự SEQ ID NO:49 (ở đây được mặc định là trình tự vùng biên 3') và các trình tự bổ sung của nó. Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, các đoạn môi trình tự

vùng 3' được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 97-105 và các trình tự bổ sung của nó.

Vẫn theo một phương án khác, sáng chế bao hàm một cặp đoạn mỗi polynucleotit chứa một đoạn mỗi polynucleotit thứ nhất và một đoạn mỗi polynucleotit thứ hai, hai đoạn mỗi này sẽ hoạt động cùng nhau khi có mặt khuôn ADN của dòng MIR162 trong một mẫu để tạo ra một đoạn khuếch đại chuẩn đoán cho dòng MIR 162. Theo một khía cạnh của phương án này, đoạn mỗi thứ nhất và/ hoặc đoạn mỗi thứ hai được chọn từ trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc các trình tự bổ sung của nó. Theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn mỗi thứ nhất và/ hoặc đoạn mỗi thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 15-35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 42 hoặc các trình tự bổ sung của nó. Cũng theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn khuếch đại được tạo ra nhờ các cặp đoạn mỗi trên chứa các trình tự SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 44 và các trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm một cặp đoạn mỗi polynucleotit chứa một đoạn mỗi thứ nhất và một đoạn mỗi thứ hai, hai đoạn mỗi này sẽ hoạt động cùng nhau khi có mặt mạch khuôn ADN của dòng MIR 162 trong một mẫu để tạo ra một đoạn khuếch đại là chuẩn đoán cho MIR162, trong đó đoạn mỗi thứ nhất là hoặc bổ sung với, trình tự hệ gen của cây ngô nằm ở biên của điểm chèn một trình tự ADN ngoại lai được chèn vào hệ gen của dòng MIR 162 và trình tự đoạn mỗi polynucleotit thứ hai là hoặc bổ sung với, trình tự ADN ngoại lai được chèn vào hệ gen của dòng MIR 162.

Theo một khía cạnh của phương án này, đoạn mỗi polynucleotit thứ nhất chứa ít nhất 10 nucleotit liên tiếp từ một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm chứa các nucleotit 1-1088 của trình tự SEQ ID NO: 49, các nucleotit 9391-10579 của trình tự SEQ ID NO: 49 và các trình tự bổ sung của nó. Theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn mỗi thứ nhất được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 68-72, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 97-105 và các trình tự bổ sung của chúng. Theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn mỗi thứ hai chứa ít nhất 10 nucleotit liên tiếp từ vị trí 1089-9390 của trình tự SEQ ID NO: 49 hoặc các trình tự bổ sung của nó. Cũng theo một khía cạnh của phương án này, đoạn mỗi thứ hai được chọn từ một nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 15-

35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 50-52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 96 và các trình tự bổ sung của chúng.

Theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn mỗi polynucleotit thứ nhất, nêu trong SEQ ID NO: 36 và đoạn mỗi polynucleotit thứ hai, nêu trong SEQ ID NO: 37, sẽ hoạt động cùng nhau khi có mặt mạch khuôn ADN của dòng MIR 162 trong một phản ứng để tạo ra một đoạn khuếch đại là chuẩn đoán cho dòng MIR162 như đã được mô tả trong ví dụ 4. Theo một phương án của khía cạnh này, đoạn khuếch đại chứa trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 38.

Cũng theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn mỗi polynucleotit thứ nhất, nêu trong SEQ ID NO: 39 và đoạn mỗi polynucleotit thứ hai, nêu trong SEQ ID NO 40, sẽ hoạt động cùng nhau khi có mặt mạch khuôn ADN của dòng ngô MIR162 trong một phản ứng để tạo ra một sản phẩm là chuẩn đoán cho dòng ngô MIR162 như đã được mô tả trong ví dụ 4. Theo một phương án của khía cạnh này, đoạn khuếch đại bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 41.

Theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn mỗi polynucleotit thứ nhất, được nêu trong SEQ ID NO: 53 và đoạn mỗi polynucleotit thứ hai, nêu trong SEQ ID NO: 54, sẽ hoạt động cùng nhau khi có mặt mạch khuôn ADN của dòng ngô MIR162 trong một phản ứng để tạo ra một sản phẩm là chuẩn đoán cho dòng ngô MIR 162 như đã được mô tả trong ví dụ 5. Theo một phương án, đoạn khuếch đại bao gồm trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 55.

Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, đoạn mỗi polynucleotit thứ nhất, nêu trong SEQ ID NO: 58 và đoạn mỗi polynucleotit thứ hai, nêu trong SEQ ID NO: 56, cùng thực hiện chức năng trong sự có mặt mạch khuôn ADN của dòng ngô MIR162 trong cùng một mẫu để tạo ra đoạn khuếch đại là chuẩn đoán cho dòng ngô MIR162 như mô tả ở Ví dụ 5. Theo một phương án, đoạn khuếch đại gồm trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 59.

Tất nhiên, sẽ là tốt khi với các kỹ năng đã có có thể thu được trình tự xa hơn về phía vùng biên thuộc trình tự ADN hệ gen cũng như là đoạn kết thúc của trình tự ADN ngoại lai được chèn vào để sử dụng như trình tự đoạn mỗi nhằm khuếch đại các trình là

chuẩn đoán cho dòng MIR162. Để làm rõ mục đích của phần diễn giải này, cụm từ “xa hơn về phía vùng biên thuộc trình tự ADN hệ gen cũng như là đoạn kết thúc của trình tự ADN ngoại lai được chèn vào” đặc biệt chỉ sự dịch chuyển dọc theo trình tự, ra xa khỏi các điểm kết thúc của các trình tự ADN ngoại lai được chèn vào, là các điểm mà tại đó các trình tự ADN được chèn vào liền kề với trình tự ADN hệ gen tự nhiên và ra xa hơn về phía vùng ADN trên nhiễm sắc thể mà trình tự ADN ngoại lai được chèn vào. Tốt hơn, một trình tự đoạn mỗi tương ứng hoặc bổ sung với một phần của đoạn chèn nên là mỗi cho việc kéo dài sự phiên mã của một mạch ADN hay ARN mới về phía trình tự liên kết biên gần nhất. Do đó, một trình tự đoạn mỗi tương ứng hoặc bổ sung với một phần trình tự vùng biên thuộc hệ gen nên là mỗi cho việc kéo dài phiên mã một sợi ADN hoặc ARN mới về phía vùng trình tự liên kết biên gần nhất. Một trình tự đoạn mỗi có thể là hoặc có thể là bổ sung với, một trình tự ADN ngoại lai chèn vào nhiễm sắc thể của thực vật hoặc vùng trình tự biên thuộc hệ gen. Một người hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ dễ nhận thấy có lợi hay không khi trình tự đoạn mỗi nên là hoặc nên bổ sung với, trình tự có trong ADN ngoại lai được chèn hoặc được nêu trong SEQ ID NO: 38 phụ thuộc vào bản chất của sản phẩm mong muốn có được nhờ việc sử dụng tập hợp các đoạn mỗi lồng vào nhau để sử dụng trong khuếch đại vùng trình tự biên có chứa vùng liên kết giữa trình tự ADN hệ gen với trình tự ADN ngoại lai chèn vào.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm một protein có tính kháng côn trùng đã được tinh chế có trình tự SEQ ID NO: 2 và một phân tử axit nucleic mã hóa cho SEQ ID NO: 2. Theo một khía cạnh của phương án này, phân tử axit nucleic này có trình tự SEQ ID NO: 1. Sáng chế cũng gồm có một gen dị thường gồm một promotơ liên kết linh hoạt với phân tử axit nucleic và các vectơ tái tổ hợp và các tế bào vật chủ chứa gen dị thường.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế bao hàm phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic duy nhất có ở dòng MIR162 trong mẫu có các axit nucleic của ngô, phương pháp gồm: (a) tương tác mẫu với một cặp đoạn mỗi polynucleotit và khi được dùng trong một phản ứng khuếch đại axit nucleic, với ADN hệ gen lấy từ dòng MIR162, tạo ra đoạn khuếch đại là chuẩn đoán cho dòng MIR162; (b) thực hiện phản ứng khuếch đại một axit nucleic, do đó tạo ra đoạn khuếch đại; và (c) phát hiện đoạn khuếch

đại. Theo một khía cạnh của phương án này, đoạn khuếch đại gồm một trình tự nucleotit được chọn trong nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 và các trình tự bổ sung của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic duy nhất có ở dòng MIR162 trong một mẫu có chứa các axit nucleic của ngô. Phương pháp gồm: (a) tương tác mẫu với mẫu dò. Các phân tử này lai trong các điều kiện chuẩn xác cao với ADN hệ gen từ dòng MIR162 và không lai với ADN từ mẫu đối chứng trong điều kiện chuẩn xác cao; (b) điều chỉnh mẫu và mẫu dò theo các điều kiện lai chuẩn xác cao; và (c) phát hiện sự lai của mẫu với ADN. Việc phát hiện có thể thực hiện bằng bất kỳ phương pháp nào đã được biết đến, gồm phương pháp huỳnh quang, hóa chất phát quang, phóng xạ, miễn dịch học và các phương pháp tương tự. Trong trường hợp quá trình lai để hữu dụng cho mục đích khuếch đại một trình tự xác định để tạo ra đoạn khuếch đại cho chuẩn đoán dòng MIR162, việc tạo ra và phát hiện đoạn khuếch đại bằng bất kỳ cách nào đã được biết đến nhằm chỉ rõ sự lai có chủ đích với trình tự đích, trong đó một mẫu dò hoặc một đoạn mồi được sử dụng hoặc các trình tự, trong đó hai hoặc nhiều hơn số mẫu dò hoặc đoạn mồi được sử dụng. Thuật ngữ "mẫu sinh học" có nghĩa là mẫu gồm có hoặc hy vọng có một axit nucleic gồm từ năm tới mười nucleotit nằm hoặc ở phần mở đầu hoặc ở phần kết thúc của trình tự ADN ngoại lai đã được chèn vào liên kết với vùng ADN hệ gen nằm trên nhiễm sắc thể mà ở đó ADN ngoại lai được chèn vào, ở đây cũng được biết đến như các trình tự liên kết. Thêm vào đó, trình tự liên kết bao gồm chỉ 2 nucleotit: chúng là nucleotit đầu tiên nằm trong vùng ADN biên của hệ gen ngay gần và liên kết cộng hóa trị với nucleotit đầu tiên nằm trên trình tự ADN ngoại lai được chèn vào. Theo một khía cạnh của phương án này, mẫu dò bao gồm một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm các trình tự: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 và các trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế bao hàm một bộ kit để nhận biết các axit nucleic là duy nhất đối với dòng MIR162 trong mẫu sinh học. Bộ kit này gồm ít nhất một phân tử axit nucleic gồm các polynucleotit liên tiếp có chiều dài vừa đủ, có chức năng

như một đoạn môi hoặc mẫu dò trong phương pháp phát hiện axit nucleic và dùng để khuếch đại hoặc lai với trình tự axit nucleic đích, nhằm chuẩn đoán sự có mặt của các trình tự axit nucleic duy nhất ở dòng MIR162 trong mẫu. Bộ kit còn bao gồm các nguyên liệu khác cần thiết để thực hiện các phương pháp lai hoặc khuếch đại. Theo một khía cạnh của phương án này, một phân tử axit nucleic có trong kit là một trong các trình tự SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 49. Theo một khía cạnh khác của phương án này, phân tử axit nucleic sử dụng là đoạn môi được chọn từ SEQ ID NO: 15-37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 50-54, SEQ ID NO: 56-58, SEQ ID NO: 60-105 và các trình tự bổ sung của nó. Theo một khía cạnh khác của phương án này, đoạn khuếch đại gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 hoặc các trình tự bổ sung của nó. Nhiều cách thức phát hiện có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp TAQMAN (Perkin Elmer), khuếch đại nhiệt, phản ứng chuỗi xúc tác bằng enzym ligaza, lai Southern, các phương pháp ELISA và các phương pháp phát hiện nhờ đo màu và sự phát huỳnh quang. Đặc biệt, sáng chế đưa ra các bộ kit để phát hiện sự có mặt của gen đích, nghĩa là ít nhất trình tự gen *vip3Aa20* hoặc trình tự liên kết, trong mẫu có chứa axit nucleic hệ gen từ dòng MIR162. Kit bao gồm ít nhất một polynucleotit có khả năng bám vào vị trí đích hoặc gần với vị trí đích và ít nhất một phương pháp xác định tính bám của polynucleotit với vị trí đích. Các phương pháp phát hiện có thể là huỳnh quang, hóa chất phát quang, đo màu hoặc đồng vị và có thể được kết hợp, ít nhất với các phương pháp miễn dịch để phát hiện độ bám. Một bộ kit cũng được hình dung là nó có thể phát hiện được sự có mặt của vị trí đích trong mẫu, nghĩa là ít nhất trình tự gen *vip3Aa20* hoặc một trình tự liên kết của MIR162, nhờ hai hoặc nhiều hơn trình tự polynucleotit cùng với nhau có khả năng bám với các trình tự nucleotit nằm gần kề hoặc trong khoảng 100 cặp bazơ hoặc trong khoảng 200 cặp bazơ hoặc trong khoảng 500 cặp bazơ hoặc trong khoảng 1000 cặp bazơ của trình tự đích và chúng có thể được kéo dài về phía nhau để tạo một đoạn khuếch đại có chứa ít nhất vị trí đích.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm phương pháp phát hiện protein Vip3Aa20 trong một mẫu sinh học, gồm có: (a) chiết protein từ mô của dòng MIR162; (b)

thực hiện phép thử protein chiết được theo phương pháp miễn dịch sử dụng kháng thể đặc hiệu cho protein Vip3Aa20 được tạo bởi dòng MIR162; và (c) phát hiện độ bám của kháng thể nói trên với protein Vip3Aa20.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế bao hàm mẫu sinh học có nguồn gốc từ cây ngô dòng MIR162, mô hoặc hạt, có chứa trình tự axit nucleotit là duy nhất đối với dòng ngô MIR162 hoặc trình tự bổ sung và các trình tự này được phát hiện trong mẫu bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic hoặc lai axit nucleic. Theo một khía cạnh của phương án này, trình tự nucleotit gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, hoặc SEQ ID NO: 59 và trình tự bổ sung tương ứng. Theo một khía cạnh khác của phương án này, mẫu được chọn từ nhóm gồm có bột ngô, bột ngô thô, mật đường ngô, dầu ngô, tinh bột ngô và ngũ cốc được sản xuất trong toàn bộ hoặc một phần các sản phẩm phụ làm từ ngô.

Theo một phương án khác, sáng chế bao hàm một chiết phẩm từ mẫu sinh học có nguồn gốc từ cây ngô MIR162, từ mô hoặc từ hạt – có chứa trình tự nucleotit duy nhất có ở dòng MIR162 hoặc trình tự bổ sung với nó. Theo một khía cạnh của phương án này, trình tự đó có thể được phát hiện trong chiết phẩm bằng cách sử dụng kỹ thuật khuếch đại axit nucleic hoặc kỹ thuật lai axit nucleic. Theo một khía cạnh khác của phương án này, trình tự gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, hoặc SEQ ID NO: 59 hoặc các trình tự bổ sung tương ứng. Trong khía cạnh khác của phương án này, mẫu được chọn từ nhóm gồm có bột ngô, bột ngô thô, mật đường ngô, dầu ngô, tinh bột ngô và ngũ cốc được sản xuất trong toàn bộ hoặc một phần các sản phẩm phụ làm từ ngô.

Một khía cạnh tiếp của sáng chế bao gồm cây ngô hoặc các phần của nó và hạt của cây ngô có kiểu gen của dòng ngô MIR162 chuyển gen, ở đó kiểu gen bao gồm một trình tự nucleotit đã đề cập trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 hoặc các đoạn bổ sung của chúng. Một mẫu hạt ngô gồm có các phân tử axit nucleic theo sáng chế được gửi lưu ngày 23 tháng 1 năm 2007 tại ATCC và được cung cấp mã số No. PTA-8166. Theo một khía cạnh của phương án này, cây ngô được lai gần giữa các dòng ngô CG5NA58, CG5NA58A, CG3ND97, CG5NA01, CG5NF22, CG4NU15, CG00685,

CG00526, CG00716, NP904, NP911, NP948, NP934, NP982, NP991, NP993, NP2010, NP2013, NP2015, NP2017, NP2029, NP2031, NP2034, NP2045, NP2052, NP2138, NP2151, NP2166, NP2161, NP2171, NP2174, NP2208, NP2213, NP2222, NP2275, NP2276, NP2316, BCTT609, AF031, NPH8431, 894, BUTT201, R327H, 2044BT và 2070BT. Tuy nhiên, một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra kiểu gen MIR162 có thể được đưa vào bất kỳ một giống cây nào khác mà có thể lai được giống với ngô, bao gồm các loài ngô đại và do đó danh sách các dòng lai cùng dòng trong phương án này không mang ý nghĩa bị giới hạn.

Theo phương án khác, sáng chế bao gồm cây ngô mang ít nhất trình tự ADN thứ nhất và thứ hai liên kết với nhau để tạo ra một trình tự nucleotit liên tục, trong đó, trình tự ADN thứ nhất nằm trong một trình tự liên kết và bao gồm ít nhất khoảng 11 nucleotit liên tục, được chọn từ nhóm gồm các nucleotit 1079-1098 của SEQ ID NO: 49, các nucleotit 9381-9400 và các trình tự bổ sung của nó, trong đó trình tự ADN thứ hai nằm trong trình tự ADN chèn ngoại lai, được nêu trong SEQ ID NO: 49 và trình tự bổ sung của nó; và trong đó trình tự ADN thứ nhất và thứ hai có thể dùng làm các đoạn mồi nucleotit hoặc mẫu dò để phát hiện sự có mặt của các trình tự axit nucleic dòng ngô MIR162 trong mẫu sinh học. Theo một khía cạnh của phương án này, các đoạn mồi nucleotit được sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN để khuếch đại trình tự ADN đích từ ADN gốc được chiết từ cây ngô và cây ngô này có thể phân biệt với các cây ngô khác bởi việc tạo ra một đoạn khuếch đại tương ứng với trình tự ADN mang SEQ ID NO: 45 hoặc SEQ ID NO: 47.

Các cây ngô theo sáng chế có thể đặc trưng hơn ở chỗ cắt đồng thời ADN hệ gen của cây với các endonucleaza giới hạn *KpnI*, *EcoRV* hoặc *NcoI*, kết quả tạo ra các băng lai với *vip3Aa20* có kích thước lần lượt là 8 kb, 13 kb hoặc 4,6 kb, khi sử dụng một mẫu dò *vip3Aa20* ở các điều kiện chuẩn xác cao. Mẫu dò *vip3Aa20* có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 13 được lấy làm minh họa trong đơn này.

Các cây ngô theo sáng chế đặc trưng hơn ở chỗ cắt ADN hệ gen của cây với các endonucleaza giới hạn *Acc65I* hoặc *BamHI*, dẫn đến tạo ra một băng lai *pmi* đơn lẻ, khi sử dụng mẫu dò *pmi* ở các điều kiện chuẩn xác cao. Mẫu dò *pmi* có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 14 được lấy làm minh họa trong đơn này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất cây ngô, trong đó kiểu gen MIR162 tạo ra tính kháng côn trùng ở cây ngô đó hoặc khả năng sử dụng manozơ làm nguồn cacbon hoặc đồng thời cả tính kháng sâu và khả năng sử dụng manozơ làm nguồn cacbon. Theo một khía cạnh của phương án này, kiểu gen chuyển gen mang lại tính kháng côn trùng trên cây ngô theo sáng chế có mang gen *vip3Aa20* và kiểu gen chuyển gen mang lại khả năng sử dụng manozơ làm nguồn cacbon trên cây ngô theo sáng chế có mang gen *pmi*.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp để tạo ra cây ngô kháng các động vật gây hại thuộc lớp cánh vảy, phương pháp này bao gồm: (a) lai chéo hữu tính giữa cây ngô bố mẹ thứ nhất với cây ngô bố mẹ thứ hai, trong đó, cây ngô bố mẹ thứ nhất hoặc thứ hai nói trên mang ADN dòng MIR162, theo đó tạo ra nhiều cây con thế hệ thứ nhất; (b) chọn cây con thế hệ thứ nhất có tính kháng lại một hoặc nhiều loài động vật gây hại lớp cánh vảy; (c) lai giữa các cây con thế hệ thứ nhất, theo đó tạo ra nhiều cây con thế hệ thứ hai; và (d) chọn trong các cây con thế hệ thứ 2 cây có tính kháng lại một hoặc nhiều loài động vật gây hại lớp cánh vảy; trong đó, các cây con thế hệ thứ hai có trình tự nucleotit được chọn trong nhóm gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55 và SEQ ID NO: 59.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp để tạo ra các hạt ngô lai, gồm: (a) gieo trồng các hạt ngô thuộc dòng ngô lai gần thứ nhất mang trình tự nucleotit được chọn trong nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55 và SEQ ID NO: 59 và hạt ngô thuộc dòng ngô lai gần thứ hai có kiểu gen khác; (b) nuôi dưỡng các cây ngô thu được từ việc gieo trồng trên cho đến lúc ra hoa; (c) cắt hoa nói trên của các cây thuộc một trong hai dòng; (d) lai chéo hữu tính giữa hai dòng lai cùng dòng khác nhau với nhau; và (e) thu hạt lai được tạo ra từ đó. Theo một khía cạnh của phương án này, dòng ngô lai gần thứ nhất đóng vai trò giống cái. Theo một khía cạnh khác của phương án này, dòng ngô lai gần thứ nhất đóng vai trò giống đực. Sáng chế cũng bao gồm hạt lai được tạo ra bởi phương pháp này và cây lai được trồng từ hạt này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ thấy rằng kiểu gen chuyển gen MIR162 có thể được nhập gen do nhân giống tới dòng ngô khác có mang các kiểu gen

chuyển gen khác. Ví dụ, giống ngô MIR162 có thể lai chéo với giống ngô có kiểu gen chuyển gen kháng côn trùng lớp cánh vảy thuộc dòng Bt11 (Đăng ký sáng chế Mỹ số 6,114,608 và 6,342,660. Hạt thu được và các cây thế hệ sau sẽ có được các tính trạng kháng sâu tổ hợp và kết hợp phổ hoạt động của Cry1Ab và Vip3Aa20. Tổ hợp tính trạng khác có theo sáng chế bao gồm việc kết hợp tính trạng kháng côn trùng MIR162 và tính trạng kháng côn trùng MIR604 (Công bố Đơn Sáng chế Mỹ số 2005/0216970, được công bố ngày 29 tháng 9 năm 2005. Các tính trạng được tổ hợp trong hạt thu được và thế hệ sau đem lại cho các cây này phổ hoạt tính cao; ví dụ, các cây đó hoạt động chống lại cả côn trùng gây hại thuộc lớp cánh vảy và lớp cánh cứng.

Do đó, sáng chế bao gồm phương pháp bảo vệ cây ngô chuyển gen khỏi sự ăn hại của một hoặc nhiều loại côn trùng, trong đó phương pháp này bao gồm việc tổ hợp vào cùng cây ngô chuyển gen tính trạng kháng côn trùng của Vip3Aa20 với tính trạng kháng sâu khác, khác với Vip3Aa20, do đó, các tính trạng được tổ hợp bảo vệ cây ngô chống lại sự ăn hại do một hoặc nhiều loại côn trùng tới mức độ lớn hơn được trông đợi, so với các tính trạng kháng côn trùng đơn lẻ. Theo một khía cạnh của phương án này, tính trạng kháng côn trùng Vip3Aa20 có trong dòng MIR162 được tổ hợp với tính trạng kháng côn trùng Cry3A055 có trong dòng MIR604 ở trong cùng cây ngô chuyển gen trên thông qua lai chéo hữu tính dòng MIR162 với dòng MIR604 hoặc bằng chuyển đồng thời các tính trạng đó vào cùng cây.

Các ví dụ về các dòng chuyển gen khác có thể lai chéo với dòng MIR162 gồm: dòng dung nạp glyphosat GA21, dòng kháng côn trùng cánh vảy/ dung nạp glyphosat MON802, dòng kháng côn trùng cánh vảy DBT418, dòng bất thụ đực MS3, dòng dung nạp phosphinothricin B 16, dòng kháng côn trùng cánh vảy MON 80100, dung nạp phosphinothricin T14 và T25, dòng kháng côn trùng cánh vảy 176 và dòng kháng côn trùng cánh cứng MON863, tất cả các dòng trên đều đã được biết đến trước đây. Có thể thấy rõ hơn rằng các tổ hợp hoặc tập hợp khác có thể được thực hiện với kiểu gen chuyển gen theo sáng chế và do vậy không thể xem ví dụ này nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật cũng sẽ nhận ra rằng hạt ngô chuyển gen mang kiểu gen MIR162 có thể được xử lý bằng các loại hóa chất xử lý hạt

khác nhau, gồm các chất diệt côn trùng, để làm tăng hoặc hiệp đồng với hoạt tính diệt côn trùng của protein Vip3Aa20.

Sáng chế bộc lộ trong đơn này vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể số 5 của hệ gen ngô, điểm này là ưu việt để chèn các axit nucleic ngoại lai vào. Đồng thời cũng bộc lộ một chỉ thị phân tử đầu 5' (opie2; nucleotit 1680-3338 của SEQ ID NO: 106) và chỉ thị phân tử đầu 3' (gag; nucleotit 43,275-45,086 của SEQ ID NO: 106) có ích trong việc xác định vị trí điểm đích trên nhiễm sắc thể số 5. Do vậy, sáng chế đề xuất các phương pháp để đưa các axit nucleic ngoại lai quan tâm vào điểm đích đã xác định trước này hoặc vào vùng phụ cận của điểm đích này. Sáng chế này cũng bao gồm hạt ngô và/hoặc cây ngô mang trình tự nucleotit ngoại lai được chèn vào điểm đích đã được bộc lộ hoặc vào vùng phụ cận nói chung của điểm này. Một lựa chọn để hoàn thành việc tích hợp có hướng đích như vậy là thay thế một đoạn chèn khác vào vị trí của cát xét biểu hiện *vip3Aa20* được lấy làm ví dụ trong đơn này. Nói chung, việc tái tổ hợp tương đồng có hướng đích, ví dụ là không có giới hạn, có thể được sử dụng theo sáng chế này. "Tái tổ hợp tương đồng" có nghĩa là phản ứng giữa cặp bất kì của trình tự nucleotit có các điểm tương ứng chứa một trình tự nucleotit tương đồng (tức là các trình tự tương đồng) thông qua nó hai phân tử có thể tương tác với nhau (tái tổ hợp) để tạo ra một trình tự ADN mới, tái tổ hợp. Mỗi điểm có trình tự nucleotit giống nhau ở đây được gọi là một "trình tự tương đồng". Nói chung, tần số của tái tổ hợp tương đồng tăng lên theo độ dài của trình tự tương đồng. Do vậy, khi tái tổ hợp tương đồng có thể xảy ra giữa hai trình tự nucleotit ít tương tự nhau, thì tần số tái tổ hợp (hay hiệu quả) giảm theo sự tăng lên của tính khác biệt giữa hai trình tự. Tái tổ hợp có thể đạt được bằng cách sử dụng một trình tự tương đồng trên mỗi phân tử cho và phân tử đích, bằng cách đẩy, tạo ra một sản phẩm tái tổ hợp "bổ sung chéo đơn". Theo cách khác, mỗi trình tự trong hai trình tự tương đồng có thể được đặt trên trình tự nucleotit đích hoặc cho. Tái tổ hợp giữa hai trình tự tương đồng nằm trên phân tử cho với hai trình tự tương đồng nằm trên phân tử đích tạo ra một sản phẩm tái tổ hợp "bổ sung chéo kép". Nếu các trình tự tương đồng trên phân tử cho nằm ở biên trình tự bị thao tác (ví dụ, một trình tự quan tâm), tái tổ hợp bổ sung chéo kép với phân tử đích sẽ tạo ra sản phẩm tái tổ hợp, trong đó trình tự quan tâm thế chỗ trình tự ADN, là nguyên gốc giữa các trình tự tương đồng trên phân tử đích. Sự chuyển đổi trình tự ADN giữa cho và đích qua

hiện tượng tái tổ hợp bổ sung chéo kép được đặt tên là “thay thế trình tự”. Kiểu kỹ thuật này là đối tượng của, ví dụ, Công bố Đơn Sáng chế Mỹ số 2006/0253918. Với điểm đích đã được bộc lộ và giờ đây đã được xác định và với các trình tự xung quanh điểm đích đã xác định này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể nhận ra rằng các phương pháp khác dùng cho việc tích hợp có hướng đích các axit nucleic có thể được sử dụng. Các phương pháp như vậy, được lấy làm ví dụ nhưng không chỉ giới hạn ở, đã được bộc lộ trong Công bố Đơn Sáng chế Mỹ số 2007/0039074 và 2006/0130179.

Theo một phương án, sáng chế gồm có điểm đích thuộc nhiễm sắc thể của ngô, nằm trên nhiễm sắc thể số 5, giữa một chỉ thị phân tử *opie2*, được nêu như nucleotit 1680-3338 của SEQ ID NO: 106 và một chỉ thị phân tử *gag*, được nêu như nucleotit 43,275-45,086 của SEQ ID NO: 106, trong đó, điểm đích mang một axit nucleic ngoại. Theo một phương án khác, điểm đích trên nhiễm sắc thể của ngô nằm trên nhiễm sắc thể số 5 giữa nucleotit 25,454 và 25,513 của SEQ ID NO: 106. Theo một phương án khác nữa, điểm đích trên nhiễm sắc thể có trình tự biên đầu 5' là các nucleotit 5,454 tới 25,454 của SEQ ID NO: 106 và trình tự biên đầu 3' là các nucleotit 25,513 tới 45,513 của SEQ ID NO: 106.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen gồm việc chèn một axit nucleic ngoại vào vị trí nằm trên nhiễm sắc thể số 5 nằm giữa một chỉ thị phân tử *opie2*, được nêu như nucleotit 1680-3338 của SEQ ID NO: 106 và một chỉ thị phân tử *gag*, được nêu như nucleotit 43,275-45,086 của SEQ ID NO: 106. Theo một phương án khác, axit nucleic ngoại lại được chèn vào nhiễm sắc thể số 5 giữa 25,454 và 25,513 của SEQ ID NO: 106. Theo một phương án khác nữa, axit nucleic ngoại lại được chèn vào có vùng biên đầu 5' được xác định bằng nucleotit 5,454 tới 25,454 của SEQ ID NO: 106 và có vùng biên đầu 3' xác định bằng các nucleotit 25,513 tới 45,513 của SEQ ID NO: 106.

Kiểu gen do chuyển gen của sáng chế có thể được chuyển sang bất kỳ cây ngô lai gần hoặc lai khi dùng các kỹ thuật lai tạo đã được công nhận. Mục đích của lai tạo thực vật là để kết hợp vào một cá thể nhiều tính trạng mong muốn. Với các cây trồng ngoài ruộng, các tính trạng này có thể bao gồm, sự kháng côn trùng và bệnh, chịu thuốc diệt cỏ, chịu nóng và hạn, giảm thời gian thu hoạch, tăng sản lượng và đặc tính nông nghiệp tốt

hơn. Với việc thu hoạch được cơ giới hóa của nhiều loại cây trồng, tính đồng nhất trong các đặc điểm của cây, như sự nảy mầm và kiểu mọc, tốc độ sinh trưởng, độ trưởng thành và chiều cao cây và chiều cao bắp, là quan trọng.

Các cây trồng ngoài ruộng được lấy giống thông qua các kỹ thuật nhờ lợi thế của phương pháp giao phấn thực vật. Cây là tự giao phấn nếu phấn từ một hoa được chuyển tới cùng hoặc một hoa khác trên cùng cây đó. Cây là giao phấn chéo nếu phấn lấy từ hoa trên cây khác nhau.

Các cây tự thụ phấn và được chọn theo một kiểu trong nhiều thế hệ, trở thành dạng đồng hợp tử ở hầu hết các vị trí gen và tạo ra một quần thể đồng nhất của thế hệ con cháu được chọn giống chính xác. Việc lai chéo giữa hai dòng đồng hợp tử tạo ra một quần thể cây lai đồng nhất, nhưng có thể là dị hợp tử ở nhiều vị trí gen. Việc lai chéo giữa hai cây, mỗi cây dị hợp tử ở một số vị trí gen sẽ tạo ra một quần thể cây lai khác nhau về mặt di truyền và không đồng nhất.

Ngô (*Zea mays* L.) có thể được chọn giống bằng cả kỹ thuật tự thụ phấn và thụ phấn chéo. Ngô có hoa đực và hoa cái riêng trên cây, nằm lần lượt ở cờ và bắp. Hiện tượng thụ phấn tự nhiên xảy ra ở ngô khi gió mang hạt phấn từ cờ tới râu thò ra từ phần trên bắp ngô.

Một phương pháp đáng tin cậy trong việc điều chỉnh tính hữu thụ đực ở thực vật tạo cơ hội để cải tiến lai giống thực vật. Điều này đặc biệt đúng với trường hợp phát triển các phép lai ở ngô, mà các phép lai này phụ thuộc nhiều vào một số nguồn của hệ thống bắt thụ đực. Có một số lựa chọn cho việc kiểm soát hữu thụ đực được các nhà chọn giống biết đến, ví dụ như cắt bỏ nhị đực cơ giới hoặc thủ công, sử dụng tính bất thụ đực tế bào chất, tính bất thụ đực nhân, các chất bất hoạt giao tử và các phương pháp tương tự.

Hạt ngô lai thường được sinh ra bởi một hệ thống bắt thụ đực kết hợp với việc cắt bỏ nhị đực bằng thủ công hoặc cơ giới. Hai giống ngô lai gần được trồng thành các dải xen kẽ trên một cánh đồng, và các cờ hoa mang hạt phấn được cắt bỏ khỏi một trong hai dòng (cây đực). Khi được tách khỏi các nguồn hạt phấn ngô bên ngoài, hoa của dòng bị cắt bỏ cờ sẽ chỉ được thụ phấn bởi dòng kia (cây đực) và do đó, hạt sinh ra là hạt lai và sẽ tạo ra cây lai.

Có thể tránh phương pháp cắt bỏ cờ thường không đáng tin cậy và tốn nhiều nhân lực bằng cách sử dụng một trong số nhiều phương pháp bất thụ được di truyền đã được biết đến, mỗi phương pháp sẽ có ưu điểm và hạn chế riêng. Các phương pháp này sử dụng nhiều cách khác nhau như chuyển vào thực vật một gen mã hóa một chất độc tế bào chất có liên quan tới một promoto đặc hiệu cho mô cây được hoặc một hệ thống antisense trong đó một gen quyết định tính hữu thụ được xác định và một antisense của gen đó được chèn vào cây (xem: Fabinjanski và cộng sự. EPO 89/3010153.8 công bố số 329,308 và đơn PCT PCT/CA90/00037 được công bố dưới tên WO 90/08828).

Việc sử dụng các dòng bất thụ được chỉ là một yếu tố trong quá trình tạo hạt ngô lai. Các kỹ thuật lai giống thực vật đã được biết đến và được sử dụng trong chương trình chọn giống cây ngô bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp chọn hồi qui, lai ngược, chọn giống theo phả hệ, chọn lọc nhờ đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn, chọn lọc nhờ chỉ thị di truyền và biến nạp. Sự phát triển của các giống ngô lai trong một chương trình chọn giống ngô, thông thường đòi hỏi sự phát triển các các dòng đồng hợp tử, sự lai chéo giữa các dòng này và sự đánh giá các dòng lai chéo. Các phương pháp tạo giống bằng chọn giống hồi quy hoặc chọn giống theo phả hệ được dùng để phát triển các dòng ngô từ các quần thể chọn giống. Các chương trình chọn giống ngô thường kết hợp các cơ sở di truyền từ hai hoặc nhiều hơn dòng lai hoặc các nguồn vật chất di truyền đa dạng khác vào các vốn chọn giống từ đó các dòng lai mới sẽ được phát triển bằng tự thụ phấn và chọn lọc các kiểu hình mong muốn. Các dòng mới được lai chéo với các dòng khác và cây lai của các phép lai này được đánh giá nhằm xác định dòng nào có khả năng thương mại hóa. Sự phát triển của chọn giống và các phương pháp lai ở thực vật, như được tiến hành trong chương trình chọn giống ngô, khá tốn kém và mất thời gian.

Chọn giống dựa trên phả hệ được bắt đầu bằng việc lai hai kiểu gen, mỗi kiểu gen có thể có một hoặc nhiều đặc tính mong muốn không có ở kiểu gen kia hoặc bổ sung với kiểu gen kia. Nếu hai dòng bố mẹ ban đầu không mang tất cả các đặc tính mong muốn, các nguồn khác có thể được đưa vào trong quần thể chọn giống. Trong phương pháp dựa trên phả hệ, các cây ưu thế sẽ được tự thụ phấn và được chọn trong các thế hệ liên tục. Trong các thế hệ tiếp theo, điều kiện dị hợp sẽ bị thay thế bởi các dòng đồng hợp tử do kết quả của quá trình tự thụ phấn và chọn lọc. Thông thường, trong phương pháp dựa trên

phả hệ, năm hoặc nhiều hơn thế hệ được tự thụ phấn và chọn lọc : $F_1 \rightarrow F_2$; $F_2 \rightarrow F_3$; $F_3 \rightarrow F_4$; $F_4 \rightarrow F_5$; v.v...

Chọn giống bằng chọn lọc hồi quy, ví dụ lai ngược, có thể được sử dụng để cải thiện một dòng và một dòng lai được thực hiện bằng cách sử dụng các dòng đó. Có thể sử dụng phương pháp lai ngược để chuyển một tính trạng mong muốn nào đó từ một dòng hoặc một nguồn vào một dòng khác không có tính trạng đó. Điều này có thể thực hiện xong, ví dụ, bằng phép lai đầu tiên giữa một dòng ưu thế (dòng bố mẹ hồi quy) với một dòng cho (dòng bố mẹ không hồi quy) mang các gen phù hợp với tính trạng mong muốn đó. Thế hệ con cháu sinh ra từ phép lai này sau đó được lai ngược trở lại với dòng bố mẹ hồi quy ưu thế và sau đó tiến hành chọn lọc các cây con sinh ra cho tính trạng mong muốn được chuyển từ dòng bố mẹ không hồi quy. Sau năm hoặc nhiều hơn thế hệ lai ngược cùng với việc chọn lọc tính trạng mong muốn, các cây thế hệ con sẽ đồng hợp tử về các locus phòng trừ tính trạng được chuyển, nhưng sẽ giống bố mẹ mang ưu thế về phần lớn tất cả các gen khác. Thế hệ lai ngược cuối cùng sau đó được tự thụ phấn để tạo ra thế hệ lai thuần chủng về (các) gen được chuyển. Một dòng lai được phát triển từ các dòng chứa (các) gen được chuyển gần như là giống với dòng lai được phát triển từ các dòng giống nhau mà không mang (các) gen được chuyển.

Các dòng lai cùng dòng chọn lọc, tức là các dòng đồng hợp tử, thuần chủng, còn có thể được sử dụng làm nguyên liệu đầu để gây giống hoặc tạo các quần thể nguồn để từ đó phát triển các dòng lai cùng dòng khác. Các dòng lai cùng dòng được sinh ra từ các dòng lai cùng dòng chọn lọc này có thể được phát triển bằng cách sử dụng các phương pháp chọn giống theo phả hệ và chọn giống chọn lọc hồi quy đã mô tả ở trên. Ví dụ, khi phương pháp chọn giống bằng lai ngược được sử dụng để tạo ra các dòng được sinh ra này trong một chương trình chọn giống ngô, các dòng lai cùng dòng chọn lọc có thể được dùng làm dòng bố mẹ hoặc quần thể nguồn hoặc nguyên liệu ban đầu và có thể được sử dụng làm thể nhận hoặc bố mẹ hồi quy.

Cây ngô lai đơn sinh ra từ phép lai hai dòng lai cùng dòng, mỗi dòng mang một kiểu gen bổ sung với kiểu gen của dòng kia. Cây lai của thế hệ thứ nhất được ký hiệu là F_1 . Trong việc phát triển các cây lai có giá trị thương mại trong chương trình chọn giống ngô, chỉ các cây lai F_1 là được yêu cầu. Các cây lai F_1 thường khỏe hơn dòng bố mẹ của

chúng. Tính khỏe của cây lai này, hay còn gọi là ưu thế giống lai có thể được thể hiện qua nhiều tính trạng, bao gồm khả năng sinh trưởng sinh dưỡng tăng lên và sản lượng tăng lên.

Việc phát triển cây ngô lai trong chương trình chọn giống ngô bao gồm ba bước: (1) Chọn lọc các cây từ các nguồn vật chất di truyền khác nhau cho phép lai đầu tiên; (2) Tự thụ phấn các cây được chọn từ các phép lai cho một vài thế hệ để tạo ra một loạt các dòng lai cùng dòng, các dòng này mặc dù có khác nhau, nhưng vẫn khá đồng nhất; và (3) lai các dòng cùng dòng chọn lọc với các dòng cùng dòng khác nhau để sinh ra cây lai (F_1). Trong quá trình chọn giống ở ngô, tính ổn định của các dòng này sẽ bị giảm đi. Tính khỏe được phục hồi khi lai hai dòng khác nhau để sinh ra cơ thể lai (F_1). Một kết quả quan trọng của đồng hợp tử và tính đồng nhất của các dòng lai là cây lai giữa một cặp nhất định của các dòng luôn là giống nhau. Một khi các dòng sẽ tạo cây lai ưu thế được xác định thì hạt lai mới có thể sinh sản miễn là tính đồng nhất của các cây lai bố mẹ vẫn được duy trì.

Lai chéo đơn được tạo ra khi hai dòng cây được lai chéo để tạo ra thế hệ F_1 . Lai chéo kép được tạo ra từ bốn dòng cây lai chéo từng cặp ($A \times B$ và $C \times D$) và tiếp sau, các con lai thế hệ F_1 được lai chéo lẫn nữa $(A \times B) \times (C \times D)$. Lai chéo ba đường được tạo ra từ ba dòng cây, trong đó hai trong các dòng cây này được lai với nhau ($A \times B$) và sau đó lai F_1 tạo ra được lai chéo với dòng cây thứ ba $(A \times B) \times C$. Nhiều tính trội của cây lai thể hiện ở đời lai F_1 bị mất trong thế hệ kế tiếp (F_2). Hệ quả, hạt từ cây lai không được sử dụng để dự trữ gieo trồng.

Việc sản xuất hạt lai yêu cầu phải loại bỏ hoặc bất hoạt phần hoa được tạo bởi cây mẹ. Loại bỏ hoặc bất hoạt không hoàn toàn phần hoa dẫn đến nguy cơ tự thụ phấn. Hạt được tự thụ phấn không cố ý như vậy có thể được thu hoạch một cách không chủ tâm và được đóng gói cùng hạt lai.

Ngay khi hạt được gieo, có thể xác định và chọn được các cây có nguồn gốc tự thụ phấn. Các cây tự thụ phấn này nói chung sẽ tương đương với dòng cây cái đã được sử dụng để tạo ra hạt lai.

Diễn hình, các cây là kết quả của tự thụ phấn này có thể được xác định và chọn dựa vào tình trạng kém hơn của chúng. Các cá thể cái được xác định bởi sự xuất hiện

mạnh mẽ ít hơn đối với các đặc điểm sinh dưỡng và/hoặc sinh sản, bao gồm chiều cao cây ngắn hơn, kích thước bắp nhỏ, hình dạng bắp và nhân, mẫu lõi hoặc các đặc tính khác.

Việc xác định các dòng tự thụ phấn cũng có thể được thực hiện bằng các phân tích chỉ thị phân tử. Xem “The Identification of Female Selfs in Hybrid Maize: A Comparison Using Electrophoresis and Morphology” Smith, J. S. C. và Wych, R. D., *Seed Science and Technology* 14, pp. 1-8 (1995). Nhờ các công nghệ này, hiện tượng đồng hợp tử ở dòng cây có được do tự thụ phấn được kiểm tra bằng cách phân tích về kết cấu alen ở nhiều vị trí trong hệ gen. Các phương pháp này cho phép nhanh chóng tiến hành xác định vấn đề sáng chế trình bày ở đây. Xem thêm, “Xác định các Cây không đúng kiểu ở Hạt Ngô Lai bằng Điều chỉnh sau và Phương pháp điện di” Sarca, V. et al., *Probleme de Genetica Teoritica si Aplicata* Vol. 20 (1) p. 29-42.

Như hoàn toàn rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, phần trước là một vài cách nhờ đó dòng cây theo sáng chế có thể thu được bởi các tìm kiếm để chuyển kiểu gen chuyển gen theo sáng chế vào các dòng ngô khác. Dòng ngô khác có nghĩa là các dòng đã có sẵn và ví dụ ở phần trên chỉ mang nghĩa minh họa

Các ví dụ sau chỉ nhằm mục đích dự định đưa ra để minh họa một hoặc nhiều phương án được ưu tiên theo sáng chế và không được hiểu là giới hạn về phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Biến nạp và chọn lọc dòng MIR162

Dòng MIR604 được tạo ra bằng biến nạp dòng ngô chủ (*Zea mays*) qua vi khuẩn trung gian *Agrobacterium*. Các phôi non được biến nạp chủ yếu như được mô tả trong Negrotto và cộng sự (*Plant Cell Reports* 19: 798-803, 2000), dùng đoạn ADN từ plasmit pNOV1300 (SEQ ID NO: 3). pNOV1300 có trình tự nucleotit chứa cát xét biểu hiện nối tiếp. Cát xét biểu hiện thứ nhất có một promotơ ZmUbiInt từ gen *Zea mays* polyubiquitin có intron thứ nhất (GenBank® Đăng ký số S94464) liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa gen vip3Aa19 liên kết linh hoạt tiếp với Intron PEPC #9 từ gen phosphoenolpyruvat carboxylaza (GenBank® Đăng ký Số X15239) từ *Zea mays* (Matsuoka và Minami, 1989. *European J. Of Biochem.* 181:593-598) và một trình tự gen kết thúc 35S từ 35S ARN từ

hệ gen vi rut khảm súp lơ (tương tự GenBank® Đăng ký Số AF140604). Chức năng của nó là cung cấp một trình tự có bổ sung chuỗi poly (Franck et al., 1980. Cell 21:285-294). Gen *vip3Aa19* trong pNOV1300 mang một trình tự mã hóa gen *vip3Aa* ngô tối ưu hoá tổng hợp (Estruch et al., 1999.), trình tự này được tổng hợp để tạo cách sử dụng codon tốt hơn cho ngô (Murray và cộng sự, 1989). Trình tự mã hóa *Vip3Aa19* tổng hợp được dùng trong biến nạp thực vật mã hoá trình tự axit amin giống với trình tự mã hóa *Vip3Aa19* tự nhiên được tìm thấy trong vi khuẩn đất *Bacillus thuringensis* chủng AB88 (US Patent 5,877,012), với ngoại lệ là khác biệt về axit amin đơn ở vị trí 284; trình tự mã hóa *vip3Aa1* tự nhiên mã hóa cho lizin, trong khi đó, trình tự mã hóa *Vip3Aa19* tổng hợp lại mã hóa glutamin ở vị trí này. Trình tự mã gen *vip3Aa19* tổng hợp này mã hoá protein phòng trừ côn trùng, *Vip3Aa19* tạo ra tính kháng côn trùng cánh vảy. Cát xét biểu hiện thứ hai có promotơ *ZmUbiInt* liên kết linh hoạt với trình tự mã *pmi* (cũng được biết là *E.coli manA*) mã hoá enzym phosphomanoza isomeraza (GenBank® Đăng ký số M15380), nó xúc tác cho quá trình isome hoá manozơ-6-phosphat thành fructozơ-6-phosphat (Negrotto et al., 2000). Trình tự mã *pmi* liên kết linh hoạt thêm với trình tự kết thúc phiên mã nopalín synthaza đầu 3' và trình tự bổ sung chuỗi polyadenyl hóa.

Phôi non được cắt từ bắp 8-12 ngày tuổi và rửa bằng môi trường sạch để chuẩn bị biến nạp. Phôi được trộn với huyền phù các tế bào *Agrobacterium* có chứa vec tơ biến nạp pNOV1300, khuấy xoáy 30 giây và để ủ thêm 5 phút. Dung dịch thừa có chứa *Agrobacterium* được hút ra, phôi sau đó được chuyển vào đĩa có chứa môi trường dinh dưỡng không chọn lọc. Phôi được nuôi cùng với *Agrobacterium* còn lại ở 22°C từ 2 đến 3 ngày trong tối. Phôi được chuyển đến môi trường dinh dưỡng có bổ sung ticarcillin (100 mg/ml) và bạc nitrat (1,6mg/l) và ủ trong tối 10 ngày. Thể sản từ phôi được chuyển vào môi trường nuôi cấy tế bào có chứa manozơ.

Cây non tái sinh được thử bằng phép phân tích TAQMAN® PCR (xem Ví dụ 2) để kiểm tra sự có mặt của cả hai gen *pmi* và *vip3Aa19*, cũng như để kiểm tra sự vắng mặt của gen kháng kháng sinh spectinomycin (*spec*). Sau đó, đã phát hiện ra (xem ví dụ 4 dưới đây) rằng trong quá trình biến nạp, hai đột biến được đưa vào trình tự mã hóa *Vip3Aa19*, một trong chúng làm thay đổi axit amin trong protein *Vip3Aa19*. Do đó, trình tự mã hóa *Vip3Aa* mới này là duy nhất đối với dòng MIR162 và được gọi là *vip3Aa20*.

Trình tự mã hóa Vip3Aa20 mã hoá isoleucin ở vị trí 129 thay cho methionin như được mã hóa bởi gen *vip3Aa19*.

Các cây dương tính đối với cả hai sự chuyển gen và âm tính đối với gen *spec* được chuyển vào nhà kính cho bước nhân giống tiếp theo. Các dòng dương tính được nhận biết và sàng lọc khi dùng các phép thử sinh học côn trùng chống sâu cắn gié mùa thu. Các dòng kháng sâu được xác định số bản sao bằng phép phân tích TAQMAN. MIR162 được chọn cho phân tích tiếp sau dựa trên việc có bản sao chuyển gen đơn, biểu hiện protein tốt khi được nhận biết bằng ELISA và hoạt tính trừ sâu tốt với sâu cắn gié mùa thu.

Phả hệ nhân giống của dòng MIR162 như sau: cây T₀ MIR162 (x NPH8431)→→NPH8431 (MIR162) F₁ (x NP2161)→NP2161(MIR162) F₁ (x NP2161)→NP2161 (MIR162) BC1F₁ (x B9620)→F₁ (x B9620)→BC1F₁ (x B9620)→BC2F₁ (x B9620)→BC3F₁ (x B9620)→BC4F₁ (x B9620). Nguyên liệu thực vật lấy từ thế hệ BC4 được dùng cho phép phân tích Southern, xác định số bản sao và giải mã trình tự ADN chèn. Các đối chứng âm tính đối với thử nghiệm bao gồm 10 cây khác biệt về vật liệu di truyền (segregant) âm tính từ thế hệ BC4.

Ví dụ 2. Phát hiện MIR162 bằng TAQMAN PCR

Phép phân tích TAQMAN chủ yếu được tiến hành như đã mô tả trong *Ingham và cộng sự* (Biotechniques, 31:132-140, 2001). Nói gọn lại, ADN thuộc hệ gen được tách từ lá của các cây ngô chuyển gen và không chuyển gen khi dùng kit Puregene® Genomic ADN Extraction (chiết ADN hệ gen) (Gentra Systems, Minneapolis, MN) chủ yếu là theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất, trừ các bước tiến hành trên khay 1,2ml 96 giếng. Phần ADN khô được hòa tan lại thành huyền phù trong dung dịch đệm TE (10mM Tris-HCl, pH= 8,0, 1mM EDTA).

Các phản ứng TAQMAN PCR được tiến hành trong các khay 96 giếng. Để phòng trừ gen ngô nội sinh, các đoạn mồi và mẫu dò được thiết kế đặc hiệu cho trình tự mã alcohol dehydrogenaza (*adhI*) của *Zea mays* (Genbank, đăng ký số AF044295). Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể thấy rằng các gen ngô khác có thể được dùng làm gen kiểm tra nội sinh. Các phản ứng nhiều thành phần để khuếch đại đồng thời *vip3Aa* và *adhI* hoặc *pmi* và *adhI*. Đối với mỗi mẫu, hỗn hợp chính được tạo ra bằng

cách kết hợp 20 μ L ADN của hệ gen chiết được với 35 μ L 2xTAQMAN Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)) được bổ sung bằng các đoạn mồi đến nồng độ cuối cùng là 900nM cho mỗi mẫu, bằng các mẫu dò đến nồng độ cuối cùng là 100 nM cho mỗi mẫu và bằng nước đến thể tích cuối cùng là 70 μ L. Hỗn hợp này được chia thành ba phần, mỗi phần 20 μ L, đưa vào các khay khuếch đại 96 giếng và được bịt kín bằng màng bịt quang học nóng, sạch (Marsh Bio Products). PCR được chạy trên thiết bị ABI Prism 7700 khi dùng các thông số khuếch đại sau: 2 phút ở 50°C và 10 phút ở 95°C, nối tiếp bằng 35 chu kỳ 15 giây ở 95°C và 1 phút ở 60°C.

Kết quả phân tích TAQMAN cho thấy rằng dòng MIR162 có một bản sao của gen *vip3Aa20* và một bản sao của gen *pmi*.

Các đoạn mồi và mẫu dò được dùng trong các phản ứng TAQMAN PCR được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1. Các đoạn mồi được dùng trong xét nghiệm TAQMAN

Tên đoạn mồi	Trình tự của đoạn mồi	Trình tự số:
Vip3Aa-xuôi	5'CACCTTCAGCAACCCGAACCTA3'	SEQ ID NO: 4
Vip3Aa-ngược	5'GCTTAGCCTCCACGATCATCTT3'	SEQ ID NO: 5
Vip3Aa-dò	5'GTCCTCGTCGCTGCCCTTCACCT3' (đánh dấu 5'=FAM, đánh dấu 3'=TAMRA)	SEQ ID NO: 6
PMI-xuôi	5'CCGGGTGAATCAGCGTTT3'	SEQ ID NO: 7
PMI-ngược	5'GCCGTGGCCTTTGACAGT3'	SEQ ID NO: 8
PMI-dò	5'TGCCGCCAACGAATCACCGG3' (nhãn 5' = FAM, nhãn 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 9
ZmADH-267 xuôi	5'GAACGTGTGTTGGGTTTGCAT3'	SEQ ID NO: 10
ZmADH-337 ngược	5'TCCAGCAATCCTTGACACCTT3'	SEQ ID NO: 11
ZmADH-316 dò	5'TGCAGCCTAACCATGCGCAGGGTA3' (nhãn 5' = TET, nhãn 3' = TAMRA)	SEQ ID NO: 12

Ví dụ 3. Phát hiện MIR162 bằng thấm tách Southern (Southern Blot)

ADN của hệ gen dùng cho phân tích southern được tách từ hỗn hợp mô lá của 10 cây tiêu biểu cho thế hệ BC4 của MIR162 dùng chủ yếu là phương pháp của Thomas và cộng sự (Theor. Appl. Genet. 86:173-180, 1993). Tất cả các cây được dùng để tách ADN đều được phân tích riêng biệt bằng TAQMAN PCR (như đã mô tả trong ví dụ 2) để xác nhận sự có mặt của một bản sao của gen *vip3Aa20* và gen *pmi*. Đối với các mẫu đối chứng segregant âm tính, ADN được tách từ hỗn hợp mô lá của các segregant âm tính thuộc thế hệ BC4. Các cây segregant âm tính này được phân tích riêng biệt bằng TAQMAN PCR để xác nhận sự vắng của các gen *vip3Aa20* và *pmi*, nhưng các segregant này lại là dương tính với gen ngô nội sinh *adhI* như dự đoán.

Phân tích Southern được tiến hành khi dùng các kỹ thuật sinh học phân tử thông thường (xem Chomczynski, P. 1992. Analytical Biochemistry 201:34-139). ADN (7,5 µg) của hệ gen được cắt bằng các enzym giới hạn, các enzym này cắt trong đoạn MIR162 được chèn vào, nhưng không trong trình tự mã ứng với mẫu dò đặc hiệu được dùng trong thử nghiệm. Cách thức này cho phép xác định số bản sao của mỗi gen được kết hợp vào dòng MIR162, tương ứng với phần tử dò đặc hiệu được dùng cho mỗi phép phân tích Southern.

Các loạt cắt giới hạn khác được thực hiện trong đó đoạn được chèn cắt bằng các enzym giới hạn sẽ cho một mảnh với kích thước đã biết từ đoạn chèn. Cách thức này cung cấp bằng chứng thêm cho sự có mặt bản sao đơn lẻ của mỗi trình tự mã có mặt trong MIR162 và cho phép phát hiện các bản sao từng phần của đoạn chèn có thể được liên kết chặt với đoạn chèn MIR162. Các phép điện di gel agarosa và chuyển alkalin đến màng Zeta-Probe® GT (Bio-Rad, Cat. No. 162-195) và lai sau đây được tiến hành khi dùng các mẫu dò được tạo ra nhờ PCR dài đầy đủ. Các mẫu dò này được đánh dấu bằng ³²P qua việc mồi ngẫu nhiên khi dùng hệ thống MegaPrime™ (Amersham Biosciences, Cat. No. RPN1607). Lai giống được tiến hành ở 65°C, tiếp đó rửa nhiều lần trong 2X SSC, 0,1% SDS và sau đó trong 0,1X SSC và 0,1% SDS. Sau đó các màng được đưa vào tự chụp bằng tia phóng xạ.

Mỗi phép phân tích Southern có 3 mẫu đối chứng: (1) ADN từ segregant (không biến nạp) âm tính được dùng để nhận biết trình tự *Zea mays* nội sinh bất kỳ có thể lai chéo với phần tử dò đặc hiệu (element-specific); (2) ADN từ segregant âm tính đã được cho

thêm vào một lượng pNOV1300 đã được cắt tương đương với một số bản sao dựa trên kích thước plasmit được đưa vào, để thể hiện độ nhạy của thử nghiệm trong việc phát hiện bản sao gen đơn lẻ trong hệ gen *Zea mays*; và (3) plasmit pNOV1300 đã cắt tương đương một số bản sao dựa trên kích thước plasmit, để hoạt động như một mẫu đối chứng dương tính cho phản ứng lai cũng như để thể hiện độ nhạy của thử nghiệm.

Các kết quả của phân tích Southern cho thấy rằng đoạn chèn MIR162 có chứa bản sao đơn lẻ của gen *vip3Aa20* và gen *pmi* và không chứa các trình tự chủ chốt từ *pNOV1300*. Mẫu dò *vip3Aa19* (SEQ ID NO: 13) được dùng để phân tích Southern *vip3Aa20*. Các trình tự nucleotit của *vip3Aa19* và *vip3Aa20* khác nhau bởi hai nucleotit và giống nhau tới 99,9%. Bởi vậy, mẫu dò *vip3Aa19* lai với trình tự *vip3Aa20* có trong MIR162 dưới các điều kiện chuẩn xác. Khi dùng mẫu dò *vip3Aa19*, cắt bằng *KpnI* và *EcoRV* cho các đoạn lai đơn có kích thước tương ứng khoảng 8 kb và 13 kb. Hơn nữa, cắt kép bằng *NcoI* cho kết quả là băng lai đơn phù hợp với kích thước dự đoán là 4,6 kb. Khi dùng phần tử dò *pmi* (SEQ ID NO: 14), cắt bằng *Acc65I* và *BamHI* cho các băng lai đơn có kích thước tương ứng khoảng 4 kb và 6 kb. Hơn nữa, cắt kép bằng *XmaI* + *HindIII* dẫn đến hình thành băng lai đơn phù hợp với kích thước dự đoán là 8,1 kb. Băng pNOV1300 (đối chứng dương tính) *XmaI* + *HindIII* 8,1 kb cũng lai với các mẫu dò *vip3Aa19* và *pmi* như dự đoán. Một vài lai chéo trong plasmit với các mẫu dò thang ADN được phát hiện. Các thang ADN điển hình có bán trên thị trường có thể chứa một số trình tự vector có thể lai chéo với trình tự đối chứng plasmit như thu được trong thử nghiệm này. Nhưng điều này không ảnh hưởng đến các gì tìm thấy trong nghiên cứu này. Cuối cùng, phần tử dò cho phần chủ chốt của pNOV1300 không lai thể hiện không có sự hợp nhất của bất kỳ trình tự chủ chốt của vector pNOV1300 nào vào MIR162 trong suốt quá trình biến nạp.

Ví dụ 4. Trình tự đoạn chèn ADN ngoại lai

Trình tự nucleotit của các trình tự mã hóa *Vip3Aa* và *pmi* trong phân tử ADN ngoại lai được chèn vào MIR162 được coi là biểu hiện đầy đủ tính toàn vẹn của sự chèn, sự giáp nhau của các phần tử chức năng và là sự nhận biết bất kỳ thay đổi cặp bazơ riêng lẻ nào. Trình tự mã được khuếch đại từ ADN nhận được từ thế hệ BC4. Khuếch đại PCR được thực hiện khi dùng hệ thống Expand High Fidelity PCR (Roche, Cat. No. 1732650)

hoặc polymeraza ADN PfuUltra™ Hotstart High-Fidelity (Stratagene, Cat. No. 600390). Mỗi sản phẩm PCR được tách dòng riêng lẻ vào vector pCR®-XL-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K4700-20) hoặc vector pCR®-BluntII-TOPO (Invitrogen, Cat. No. K2800-20) và ba dòng riêng biệt cho mỗi sản phẩm PCR được xác định và đọc trình tự. Đọc trình tự được tiến hành bằng máy phân tích ABI3730XL có sử dụng hoá chất ABI BigDye® 1,1 hoặc Big Dye 3,1 dGTP (dùng cho khuôn mẫu giàu GC). Phân tích trình tự được thực hiện bằng gói Phred, Phrap và Consed của trường Đại học Tổng hợp Washington và được thực hiện với tỉ lệ sai sót nhỏ hơn 1/10,000 nền (Ewing & Green, 1998. Genome Research 8:186-194). Trình tự liên ứng cuối cùng của mỗi gen được xác định bằng kết hợp dữ liệu trình tự từ 3 dòng riêng biệt để tạo ra một trình tự liên ứng cho mỗi gen. Sắp xếp trình tự được thực hiện khi dùng chương trình ClustalW với các thông số sau: điểm ma trận blosum55, penalty mở quãng trống 15, penalty dẫn quãng trống 6,66 (Thompson và cộng sự, 1994. Nucleic Acids Research 22:4673-4680).

Trình tự mã hóa *Vip3Aa20* đầy đủ được khuếch đại PCR khi dùng các đoạn môi MOV3Aa-01-5': 5'ATGAACAAGAACAACACCAA3' (SEQ ID NO: 15) và MOV3Aa-01-3': 5'CTACTTGATGCTCACGTCGTAG3' (SEQ ID NO: 16) và enzym PfuUltra Hotstart tạo sản phẩm 2370 bp. Đoạn khuếch đại PCR được đọc trình tự khi dùng các đoạn môi thể hiện trên Bảng 2

Bảng 2.

Tên đoạn môi	Trình tự (5'→3')	Trình tự số
b03503b	ACGAGCAGAACCAGGTGC	SEQ ID NO: 17
b03503c	GGTGAAGAAGGACGGCAG	SEQ ID NO: 18
b03503d	ACCTGTCGCAAGCTGCTGGG	SEQ ID NO: 19
b03503e	TGGACAAGCTGCTGTGTC	SEQ ID NO: 20
b03503f	TGCAGGCCGACGAGAACAG	SEQ ID NO: 21
b03503g	TGATCCAGTACACCGTGAA	SEQ ID NO: 22
b03503h	ACCCTGACCCTGTACCAG	SEQ ID NO: 23
b03504b	GTGTTGCCGCTGATGTTG	SEQ ID NO: 24
b03504c	CGTACTCGGTCTTCGGCT	SEQ ID NO: 25
b03504d	CTGCAGGCCAAAGCCGTT	SEQ ID NO: 26
b03504e	TCGCCGTAGATCACCTCG	SEQ ID NO: 27
b03504f	GCTTGCGACAGGTGGTCA	SEQ ID NO: 28
b03504g	TTGCTGCTGGTCTCGGTGG	SEQ ID NO: 29

b03504h	CGTTGGCGATCTTAAGGAT	SEQ ID NO: 30
b00203c	GCAAGCCATCGATTCAC	SEQ ID NO: 31
b00203d	GCAACACCCTGACCCTG	SEQ ID NO: 32
b00203e	TCTACGACGTGAGCATCAAG	SEQ ID NO: 33
b00203f	GTAGAAGTGCACGATCGGG	SEQ ID NO: 34
b00203g	CGGTGCTGGTCCAGTTG	SEQ ID NO: 35

Hai phản ứng PCR khác nhau gộp và phủ toàn bộ trình tự mã hóa *Vip3Aa20*. Đầu 5' của *vip3Aa20* được phủ bằng khuếch đại PCR khi dùng các đoạn mồi

162INSERT-F2: 5'ACACCAATGATGCAAATAGGC3' (SEQ ID NO: 36) và VIP_R4 5'GAAGGTGTTTCAGGTAGAACTCGAAG3' (SEQ ID NO: 37) và enzym Expand High Fidelity. Phản ứng thứ hai phủ đầu 3' của *vip3Aa20*; sản phẩm được khuếch đại bằng các đoạn mồi VIP-F3: 5'GGTGCTGTTTCGAGAAGAGGT3' (SEQ ID NO: 42) và PMI_REV1: 5'CGATTTATCACTCTCAATCACAT3' (SEQ ID NO: 43) và enzym Expand High Fidelity. Các đoạn khuếch đại do các phản ứng này sinh ra có tương ứng trình tự nucleotit 2946 bp (SEQ ID NO: 38) và trình tự nucleotit 2577 bp (SEQ ID NO: 44).

Dữ liệu trình tự liên ứng cho thấy hai thay đổi nucleotit trong trình tự mã hóa *Vip3Aa* thuộc MIR162 (được gọi là *vip3Aa20*) so với trình tự mã hóa *Vip3Aa* thuộc pNOV1300 (được gọi là *vip3Aa19*) được dùng để biến đổi MIR162. Thay đổi nucleotit thứ nhất, đột biến G sang T, xảy ra ở vị trí 387 của trình tự mã hóa *Vip3Aa19* (SEQ ID NO: 3). Đột biến này làm cho methionin ở vị trí 129 của *Vip3Aa19* thay đổi thành isoleucin trong *Vip3Aa20* (M129I). Thay đổi nucleotit thứ hai, đột biến G sang C, xảy ra ở vị trí 1683 của trình tự mã, nhưng không làm thay đổi axit amin. Do đó, trình tự mã hóa *Vip3Aa20* và protein *Vip3Aa20* là duy nhất đối với dòng MIR162 và có thể được dùng để nhận dạng bất cứ cây nào có kiểu di truyền chuyển gen MIR162. Trình tự mã *pmi* MIR162 giống hệt với trình tự trong plasmit biến nạp pNOV1300. Các protein kháng sâu *Vip3Aa20* và *Vip3Aa19* được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. So sánh các trình tự axit amin của *Vip3Aa20* và *Vip3Aa19*.

Tên	Sắp xếp trình tự
<i>Vip3Aa20</i>	(1) MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDGDDLTLDE
<i>Vip3Aa19</i>	(1) MNKNNTKLSTRALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDGDDLTLDE
<i>Vip3Aa20</i>	(51) ILKNQQLNDISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVL
<i>Vip3Aa19</i>	(51) ILKNQQLNDISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQNQVL
<i>Vip3Aa20</i>	(101) NDVNNKLD AINTMLRVYLPKITSMLSDV █ KQNYALSLQIEYLSKQLQEIS
<i>Vip3Aa19</i>	(101) NDVNNKLD AINTMLRVYLPKITSMLSDV █ KQNYALSLQIEYLSKQLQEIS
<i>Vip3Aa20</i>	(151) DKLDIINVNLINSTLTEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETSSKVKKDG
<i>Vip3Aa19</i>	(151) DKLDIINVNLINSTLTEITPAYQRIKYVNEKFEELTFATETSSKVKKDG
<i>Vip3Aa20</i>	(201) SPADILDELTELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHDVMVGNNLFGRSALK
<i>Vip3Aa19</i>	(201) SPADILDELTELTELAKSVTKNDVDGFEFYLNTHDVMVGNNLFGRSALK
<i>Vip3Aa20</i>	(251) TASELITKENVKTSGEVGNVYNFLIVLTALQAQAFLLTTCRKLLGLAD
<i>Vip3Aa19</i>	(251) TASELITKENVKTSGEVGNVYNFLIVLTALQAQAFLLTTCRKLLGLAD
<i>Vip3Aa20</i>	(301) IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPYAKVKGSDEDAKMIVE
<i>Vip3Aa19</i>	(301) IDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPYAKVKGSDEDAKMIVE
<i>Vip3Aa20</i>	(351) AKPGHALIGFEISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLL
<i>Vip3Aa19</i>	(351) AKPGHALIGFEISNDSITVLKVYEAKLKQNYQVDKDSLSEVIYGDMDKLL
<i>Vip3Aa20</i>	(401) CPDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKKMKTLRYEVTANFYDSSTGEI
<i>Vip3Aa19</i>	(401) CPDQSEQIYYTNNIVFPNEYVITKIDFTKKMKTLRYEVTANFYDSSTGEI
<i>Vip3Aa20</i>	(451) DLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMP LGVISETFLTPINGFGLQADENS
<i>Vip3Aa19</i>	(451) DLNKKKVESSEAEYRTLSANDDGVYMP LGVISETFLTPINGFGLQADENS
<i>Vip3Aa20</i>	(501) RLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLE
<i>Vip3Aa19</i>	(501) RLITLTCKSYLRELLLATDLSNKETKLIVPPSGFISNIVENGSI EEDNLE
<i>Vip3Aa20</i>	(551) PWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKP KTEYVIQYT
<i>Vip3Aa19</i>	(551) PWKANNKNAYVDHTGGVNGTKALYVHKDGGISQFIGDKLKP KTEYVIQYT
<i>Vip3Aa20</i>	(601) VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTINKRFTTGTD LKGVYLILK
<i>Vip3Aa19</i>	(601) VKGKPSIHLKDENTGYIHYEDTNNNLEDYQTINKRFTTGTD LKGVYLILK
<i>Vip3Aa20</i>	(651) SQNGDEAWGDNFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLY
<i>Vip3Aa19</i>	(651) SQNGDEAWGDNFIILEISPSEKLLSPELINTNNWTSTGSTNISGNTLTLY
<i>Vip3Aa20</i>	(701) QGGRGILKQNLQLDSFSTYRVYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAK
<i>Vip3Aa19</i>	(701) QGGRGILKQNLQLDSFSTYRVYFSVSGDANVRIRNSREVLFEKRYMSGAK

Vip3Aa20 (751) DVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPIVHFYDVSIK
Vip3Aa19 (751) DVSEMFTTKFEKDNFYIELSQGNNLYGGPIVHFYDVSIK

Chỗ bôi đen để chỉ thay đổi axit amin

Ví dụ 5. Phân tích trình tự ADN biên

Một số phương pháp đã được biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để khuếch đại trình tự ADN chưa biết liền kề với vùng trung tâm của trình tự đã biết. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, inverse PCR (iPCR) [Ochman và cộng sự, *Genetics* 120:621-623 (1988); Triglia và cộng sự, *Nucleic Acids Res.* 16:8186 (1988)], panhandle PCR [Jones và Winistorfer, *Nucleic Acids Res.* 20:595-600 (1992); Jones và Winistorfer, *Biotechniques* 23:132-138 (1997)], cassette ligation-anchored PCR [Mueller và Wold, *Science* 246:780-786 (1989)], vectorette-PCR [Riley và cộng sự, *Nucleic Acids Res.* 18:2887-2890 (1990)], novel-Alu-PCR [Puskas và cộng sự, *Nucleic Acids Res.* 22:3251-3252 (1994)] và Thermal Asymmetric Interlaced PCR (PCR kết bất đối xứng nhiệt) (TAIL-PCR) [Liu và Whittier, *Genomics* 25:673-681 (1995)].

Một phương pháp được dùng để khuếch đại trình tự ADN hệ gen ngô nằm ở vùng biên ADN ngoại lai được chèn vào dòng MIR162 là vectorette PCR chủ yếu theo mô tả của Riley và cộng sự, *Nucleic Acids Res.* 18:2887-2890 (1990).

Trình tự biên 5' và trình tự vùng nối được xác nhận khi dùng các quy trình PCR tiêu chuẩn. Các cặp đoạn mỗi sau đây hoặc các đoạn bổ sung của chúng được dùng để xác nhận trình tự này: 162INSERT-F2: 5'ACACCAATGATGCAAATAGGC3' (SEQ ID NO: 36)/ VIP_R4: 5'GAAGGTGTTTCAGGTAGAACTCGAAG3' (SEQ ID NO: 37) và CJB179: 5'ATGCAAATAGGCTGGGAATAGTC3' (SEQ ID NO: 39)/ CJB134 5'GTACCAGCTTGCTGAGTGGCT3' (SEQ ID NO: 40). Đoạn khuếch đại thu được có trình tự là SEQ ID NO: 41 và bao gồm trình tự vùng nối 5' của SEQ ID NO: 45. Cũng ghi nhận được rằng các trình tự đoạn mỗi khác có thể được dùng để xác nhận các trình tự vùng biên và vùng nối. Khi dùng phương pháp này, đoạn chèn MIR162 được thấy là bao biên đầu 5' bởi các nucleotit 1040-1088 của trình tự hệ gen ngô thể hiện trong SEQ ID NO: 46.

Một vùng lớn hơn của trình tự biên 5' từ dòng MIR162 được tạo ra khi dùng kit Seegene ADN Walking SpeedUp™ Premix theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phản ứng PCR thứ nhất được thực hiện độc lập trong 4 ống riêng biệt khi dùng đoạn mồi FE1002: 5'CGTGACTCCCTTAATTCTCCGCT3' (SEQ ID NO: 50) với một trong các đoạn mồi DW-ACP 1, 2, 3 hoặc 4 được nhà sản xuất cung cấp. Các chất phản ứng sau đây được trộn trong ống PCR đặt trong đá: 100µg ADN hệ gen MIR162, 4µl 2,5 µM DW-ACP (mỗi loại với DW-ACP 1, 2, 3 hoặc 4), 4µl 2,5 µM FE1002, 19µl nước cất và 25µl 2X SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Các ống được đặt vào máy tạo chu trình nhiệt đã được làm nóng trước (94°C). PCR được hoàn thành khi dùng chương trình sau: một chu trình ở 94°C trong 5 phút, 42°C trong 1 phút và 72°C trong 2 phút, 30 chu trình ở 94°C trong 40 giây, 55°C trong 40 giây và 72°C trong 90 giây và 1 chu trình ở 72°C trong 7 phút. Các sản phẩm PCR được tinh chế khi dùng Exonucleaza I và Shrimp Alkaline Phosphatase.

Phản ứng PCR thứ hai được thực hiện độc lập trong 4 ống riêng biệt khi dùng đoạn mồi FE1003: 5'GATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTT3' (SEQ ID NO: 51) với đoạn mồi DW-ACPN được nhà sản xuất kit cung cấp. Các chất phản ứng sau đây được trộn trong ống PCR đặt trong đá: 3µl sản phẩm PCR đã tinh chế, 1µl 10µM DW-ACPN, 1µl 10µM FE1003, 5µl nước cất và 10µl 2X SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Các ống được đặt vào máy tạo chu trình nhiệt đã được làm nóng trước (94°C). PCR được hoàn thành khi dùng chương trình sau: một chu trình ở 94°C trong 5 phút, 35 chu trình ở 94°C trong 40 giây, 60°C trong 40 giây và 72°C trong 90 giây và một chu trình ở 72°C trong 7 phút.

Phản ứng PCR thứ ba được thực hiện độc lập trong 4 ống riêng biệt khi dùng đoạn mồi FE1004: 5'GATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTT3' (SEQ ID NO: 52) với đoạn mồi đa năng được nhà sản xuất cung cấp. Các chất phản ứng sau đây được trộn trong ống PCR đặt trong đá: 2µl sản phẩm PCR đã tinh chế, 1µl 10µM đoạn mồi đa năng, 1µl 10 µM FE1004, 6µl nước cất và 10µl 2X SeeAmp™ ACPTM Master Mix II. Các ống được đặt vào máy tạo chu trình nhiệt đã được làm nóng trước (94°C). PCR được hoàn thành khi dùng chương trình sau: một chu trình ở 94°C trong 5 phút, 35 chu trình ở 94°C trong 40 giây, 60°C trong 40 giây, và 72°C trong 90 giây và 1 chu trình ở 72°C trong 7 phút.

10µl sản phẩm PCR được chạy trên bản gel agarosa 1% có chứa ethidi bromua. Băng thích hợp được chiết từ bản gel agarosa và tinh chế dùng Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN chiết được tách dòng vào vector tách dòng Invitrogen TOPO-XL theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dòng này được biến nạp vào *E. coli* và ADN plasmit được tách chiết từ tế bào sau khi nuôi qua đêm với kit Qiagen Miniprep theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Plasmit này được dùng cho đọc trình tự chạy kết thúc.

Đoạn môi mới được thiết kế trong trình tự mới, chưa biết trước đó được dùng với đoạn môi trong ADN ngoại lai chèn vào khuếch đại toàn bộ 1kb của trình tự biên bên ngoài ADN của hệ gen. Đoạn môi trình tự biên 162DWConf3: 5'CCTGTGTTGTTGGAACAGACTTCTGTC3' (SEQ ID NO: 53) và đoạn môi ADN chèn FE0900: 5'GGCTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTC3' (SEQ ID NO: 54) được dùng để khuếch đại phân tử axit nucleic có chứa trình tự biên 5' để xác nhận. Trình tự đoạn khuếch đại kết quả này đưa ra trong SEQ ID NO: 55. Đoạn khuếch đại 5' này có trình tự kể 5' đưa ra trong SEQ ID NO: 45. 10µl sản phẩm đoạn khuếch đại PCR được chạy trên bản gel agarosa 1% có chứa ethidi bromua. Băng thích hợp được tách chiết từ bản gel agarosa và tinh chế khi dùng Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN chiết được tách dòng vào vector tách dòng Invitrogen TOPO-XL theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dòng này được biến nạp vào *E. coli*. ADN plasmit được chiết từ tế bào sau khi nuôi qua đêm trong môi trường với kit Qiagen Miniprep theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ba plasmit được đọc trình tự hoàn chỉnh khi dùng các đoạn môi được thể hiện trên Bảng 4. Các trình tự plasmit này được sắp xếp để tạo ra trình tự biên 5' đã được xác nhận hoàn toàn. Khi dùng phương pháp này, khoảng 1 kb của trình tự biên 5' (SEQ ID NO: 46) được xác định.

Bảng 4. Các trình tự đoạn môi.

Tên đoạn môi	Trình tự (5'→3')	Trình tự số
b00201h	TTCACGGGAGACTTTATCTG	SEQ ID NO: 60
b00605a	CCGATTCATTAATGCAG	SEQ ID NO: 61
b00701b	ACGTAAAACGGCTTGTC	SEQ ID NO: 62

b00702b	GTTTAAACTGAAGGCGG	SEQ ID NO: 63
b00704h	AATAATATCACTCTGTACATCC	SEQ ID NO: 64
b01106f	GTTGTAAAACGACGG	SEQ ID NO: 65
b01709f	TAGGCACCCCAGGCTTTA	SEQ ID NO: 66
b03504a	AATTGAATTTAGCGGCCG	SEQ ID NO: 67
b05102f	GGTCCCTACAACATAAATAG	SEQ ID NO: 68
b05102g	TTCGTCCCTACTATCAACGC	SEQ ID NO: 69
b05102h	CTTTAGGCATCAGCGGGT	SEQ ID NO: 70
b05103a	AGCATCTGCGTAAGCACA	SEQ ID NO: 71
b05103b	CTGATGACACCAATGATGC	SEQ ID NO: 72
b05103c	GATCAGATTGTCGTTTCCC	SEQ ID NO: 73
b05103d	GCATCATTGGTGTCTATCAG	SEQ ID NO: 74
b05103e	TGTGCTTACGCAGATGCT	SEQ ID NO: 75
b05103f	ACCCGCTGATGCCTAAAG	SEQ ID NO: 76
b05103g	GCGTTGATAGTAGGGACGAA	SEQ ID NO: 77
b05103h	CTATTTATGTTGTAGGGACC	SEQ ID NO: 78
b05210a	CTAGACTGGAAAGCGGAG	SEQ ID NO: 79
b05210b	CCACTTTCATCCCTAGTTG	SEQ ID NO: 80

Trình tự biên 3' từ dòng MIR162 được tạo ra khi dùng kit Clonotech Genome Walker™ Universal (Clonotech Laboratories, Inc.) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đầu tiên, hỗn hợp các mảnh ADN hệ gen được chèn với các đoạn nối, chưa tách dòng được biết như các "thư viện" GenomeWalker được xây dựng. Mỗi thư viện được xây dựng bằng việc cắt ADN của hệ gen MIR162 với enzym giới hạn (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI* và *XmnI*) như sau: ví dụ, 25 µl ADN hệ gen MIR162 (0,1 µg/µl), 8 µl enzym giới hạn (10 units/µl), 10 µl đệm enzym giới hạn (10X) và 57 µl nước cất được trộn lẫn trong ống và ủ ở 37°C qua đêm.

Sau đó, tinh chế ADN bằng vài lần chiết phenol/clorofom. Cuối cùng, ADN được rửa và rửa bằng etanol, làm khô và hoà tan trong 20 µl đệm TE.

Để chèn các đầu đoạn nối GenomeWalker vào ADN hệ gen MIR162, 4 µl ADN hệ gen đã tinh chế, cắt được trộn lẫn với 1.9 µl đoạn nối GenomeWalker (25 µM), 1.6 µl đệm 10X Ligation và 0,5 µl enzym T4 ADN Ligase (6 đơn vị/ µl). Các phản ứng này được ủ

qua đêm ở 16°C. Các phản ứng được dừng lại bằng cách ủ ở 70°C trong vòng năm phút. Sau khi phản ứng đã dừng lại, thêm vào mỗi ống 72 µl TE và trộn kỹ.

Phản ứng PCR thứ nhất được thực hiện khi dùng đoạn mồi AP1 do nhà sản xuất cung cấp, với các đoạn mồi khác nhau được thiết kế trong phạm vi trình tự ADN chèn ngoại lai đã biết (Vòng 1 "các đoạn mồi đặc hiệu gen" hoặc "GSP1"). Các chất phản ứng sau đây được trộn trong ống PCR trong đá: 1µl thư viện ADN MIR162 thích hợp, 1µl 10 µM AP1, 1µl 10 µM GSP1, 1µl 10mM dNTP, 5µl đệm 10X Advantage 2 PCR, 1µl Polymeraza BD Advantage 2 và 40µl nước cất. PCR được hoàn thành khi dùng chương trình sau: bảy chu trình ở 94°C trong 25 giây và 72°C trong 4 phút, 32 chu trình ở 94°C trong 25 giây và 67°C trong 4 phút và 1 chu trình ở 67°C trong 4 phút. Mỗi phản ứng PCR ban đầu được pha loãng gấp 50 lần bằng cách pha 1µl sản phẩm PCR ban đầu với 49 µl nước cất. Các phản ứng hoạt động là các phản ứng với các thư viện *DraI* và *XmnI* với đoạn mồi GSP1 162GW3F1: 5'TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCCG3' (SEQ ID NO: 56) và đoạn mồi AP1.

Phản ứng PCR thứ hai được thực hiện khi dùng đoạn mồi độc lập AP2 do nhà sản xuất cung cấp, với các đoạn mồi khác nhau được thiết kế trong phạm vi trình tự ADN chèn ngoại lai đã biết (Vòng 2 "các đoạn đặc hiệu gen" hoặc "GSP2"). Các chất phản ứng sau đây được trộn trong ống PCR trong đá: 1µl sản phẩm PCR ban đầu đã được pha loãng thích hợp, 1µl 10µM AP2, 1µl 10µM GSP2, 1µl 10mM dNTPs, 5µl đệm 10X Advantage 2 PCR, 1µl Polymeraza of BD Advantage 2 và 4 µl nước cất. PCR được hoàn thành khi dùng chương trình sau: 5 chu trình ở 94°C trong 25 giây và 72°C trong 4 phút, 20 chu trình ở 94°C trong 25 giây và 67°C trong 4 phút và 1 chu trình ở 67°C trong 4 phút. Các phản ứng hoạt động là các phản ứng với các thư viện *DraI* và *XmnI* với đoạn mồi GSP2 162GW3F2: 5'AAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCG3' (SEQ ID NO: 57) và đoạn mồi AP2.

10 µl sản phẩm PCR được chạy trên bản gel agarosa 1% có chứa ethidi bromua. Băng thích hợp được chiết từ bản gel agarosa và tinh chế khi dùng Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN chiết được tách dòng vào vector tách dòng Invitrogen TOPO-XL theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dòng này được biến nạp vào *E. coli* và ADN plasmit được chiết từ tế bào sau khi nuôi qua đêm với kit Qiagen

Miniprep theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Plasmid này được đọc trình tự khi dùng đọc trình tự chạy kết thúc.

Đoạn môi mới được thiết kế trong trình tự mới, chưa biết trước đó được dùng với đoạn môi trong ADN chèn vào khuếch đại khoảng 1 kb của trình tự biên 3' bên ngoài ADN của hệ gen. Đoạn môi ADN chèn 162GW3F1: 5'TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCCG3' (SEQ ID NO: 56) và đoạn chèn trình tự biên 3' 1623'GWR1: 5CTGGTGAACCGATTTTACGGAGG3' (SEQ ID NO: 58) được dùng để khuếch đại phân tử axit nucleic có trình tự biên 3' dùng cho việc xác nhận. Trình tự đoạn khuếch đại kết quả này đưa ra trong SEQ ID NO: 59. Đoạn khuếch đại 3' này có trình tự vùng nối 3' đưa ra trong SEQ ID NO: 47. 10µl đoạn khuếch đại PCR được chạy trên bản gel agarosa 1% có chứa ethidi bromua Bảng thích hợp được chiết từ bản gel agarosa và tinh chế khi dùng Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN chiết được tách dòng vào vector tách dòng Invitrogen TOPO-XL theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dòng này được biến nạp vào *E. coli*. ADN plasmid được chiết từ tế bào sau khi nuôi qua đêm trong môi trường với kit Qiagen Miniprep theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ba plasmid được đọc trình tự hoàn chỉnh khi dùng các đoạn môi được thể hiện trên Bảng 5. Các trình tự plasmid này được sắp xếp để tạo ra trình tự biên 3' đã được xác nhận hoàn toàn (SEQ ID NO: 48).

Bảng 5. Các trình tự đoạn chèn.

Tên đoạn chèn	Trình tự (5'→3')	Trình tự số
b00106a	GATTGAATCCTGTTGCC	SEQ ID NO: 81
b00106b	TCTCATAAATAACGTCATGC	SEQ ID NO: 82
b00108a	TCTGTGGATAACCGTATTAC	SEQ ID NO: 83
b00201h	TTCACGGGAGACTTTATCTG	SEQ ID NO: 60
b00605a	CCGATTCATTAATGCAG	SEQ ID NO: 61
b00704h	AATAATATCACTCTGTACATCC	SEQ ID NO: 64
b00712e	AGTAACATAGATGACACCGC	SEQ ID NO: 84
b01106a	CCAGTGTGCTGGAATTCG	SEQ ID NO: 85
b01106f	GTTGTAAAACGACGG	SEQ ID NO: 65
b01107h	CCAGTGTGATGGATATCTGC	SEQ ID NO: 86
b01108e	CCAGTGTGCTGGAATTCG	SEQ ID NO: 87

b01111f	CCAGTGTGATGGATATCTGC	SEQ ID NO: 88
b01709f	TAGGCACCCCAGGCTTTA	SEQ ID NO: 66
b02701a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 89
b02701e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 90
b02702a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 91
b02702e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 92
b02703a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 93
b02703e	TATCTGCAGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 94
b02704a	GTGTGCTGGAATTCGCCCTT	SEQ ID NO: 95
b02811a	GGTCTTGCGATGATTATC	SEQ ID NO: 96
b05104c	GAGAGGAATGGCAGCAGA	SEQ ID NO: 97
b05104d	CATGACGGGTTTGAGATT	SEQ ID NO: 98
b05104e	AATCTCAAACCCGTCATG	SEQ ID NO: 99
b05104f	TCTGCTGCCATTCCTCTC	SEQ ID NO: 100
b05104g	GATCAACCCGGAGAGGAAT	SEQ ID NO: 101
b05104h	CCATGACGGGTTTGAGAT	SEQ ID NO: 102
b05105c	CAACCGACCTGACAAGTGAC	SEQ ID NO: 103
b05105e	ATCTCAAACCCGTCATGG	SEQ ID NO: 104
b05105f	ATTCCTCTCCGGGTTGATC	SEQ ID NO: 105

Ví dụ 6. Phát hiện Protein Vip3Aa20 trong MIR162 bằng ELISA

Các chiết phẩm được điều chế từ lá, rễ, lõi, râu, hạt, phân và toàn bộ cây. Chúng được phân tích định lượng đối với Vip3Aa20 bằng ELISA khi dùng các kháng thể đa dòng kháng Vip3A từ dê tinh chế bằng ái lực miễn dịch và kháng Vip3A từ thỏ tinh chế bằng Protein A theo các phương pháp ELISA đã được biết đến. Vip3Aa20 được phát hiện trong tất cả các mô được phân tích ở mọi giai đoạn phát triển. Nồng độ trung bình của protein Vip3Aa20 được phát hiện trong toàn bộ cây ở các thời kỳ nở hoa và kết hạt tương ứng là 10µg/g trọng lượng cây tươi và 16µg/g trọng lượng cây tươi. Nồng độ trung bình của protein Vip3Aa20 trong lá ở thời kỳ nở hoa là 22 µg/g trọng lượng cây tươi.

Ví dụ 7. Hiệu lực trên cánh đồng của MIR 162

Dòng MIR 162 được thử trên ruộng về hiệu quả kháng sâu cắn gié vụ đông (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đục bắp ngô (CEW, *Helicoverpa zea*), sâu ngài đêm đen

(BCW, *Agrotis ipsilon*) và sâu đục thân ngô Châu Âu (ECB, *Ostrinia nubilalis*). Tính năng của dòng MIR 162 được so sánh với tính năng của Warrior® (Syngenta, Inc.), một tiêu chuẩn thuốc trừ sâu thông dụng được áp dụng ở tỉ lệ 11,2g a.i./ mẫu Anh, dòng ngô chuyển gen Bt11 mang gen *cryIAb* và cây lai Bt11 X MIR 162, được tạo thành bởi lai dòng lai cùng dòng Bt11 với dòng lai cùng dòng MIR 162.

28 thử nghiệm được trồng ở 13 bang đại diện cho các vùng trồng ngô chính thuộc Liên bang Mỹ lục địa (USA không kể các bang là quần đảo). Các thử nghiệm được trồng trên một lô đất hoàn toàn ngẫu nhiên chia thành 4 mảnh giống nhau. Các mảnh đánh luống 17,5 ft Anh (5,3m) cho mỗi thử nghiệm ở mỗi mảnh giống nhau. Mật độ trồng đạt khoảng 30.000 cây/mẫu Anh (74.129 cây/hecta). Các dải chuẩn đoán miễn dịch được dùng để xác nhận sự có hay vắng mặt của các protein Vip3Aa20 và Cry1Ab trong các nhóm thử nghiệm khác nhau.

Nhiễm côn trùng tự nhiên được dùng trong các phép thử với mật độ đủ lớn; ở nơi không bị nhiễm tự nhiên, nhiễm nhân tạo được tiến hành. Nhiễm nhân tạo với hai loại ấu trùng lột xác lần 2 và lần 3 ở V1-V2 được dùng trong các thử nghiệm BCW. Các mảnh được đánh giá ở 3, 7 và 14 ngày sau nhiễm. Các cây bị tổn hại một phần và các cây bị cắt hoàn toàn được ghi nhận là tổn hại do BCW. Các mảnh thử nghiệm với FAW được đánh giá 7 và 14 ngày sau nhiễm hoặc sau khi thu được các ấu trùng lột xác lần 3 ở các cây đối chứng. Thang sau đây được dùng để đánh giá tổn hại trên lá do FAW và CEW:

0,01- Tổn hại trên lá không thấy được

- 1- Tổn hại lỗ châm kim trên một ít lá
- 2- Một lượng nhỏ tổn hại lỗ nhỏ trên một ít lá
- 3- Tổn hại lỗ nhỏ trên một số lá
- 4- Tổn hại lỗ nhỏ và các vết tổn thương trên một ít lá
- 5- Các vết tổn thương trên một số lá
- 6- Các vết tổn thương lớn trên một số lá
- 7- Các vết tổn thương lớn và các phần bị ăn mất trên một ít lá
- 8- Các vết tổn thương lớn và các phần bị ăn mất trên một số lá
- 9- Các vết tổn thương lớn và các phần bị ăn mất trên hầu hết các lá

Tổn hại cho cây được đánh giá cho cả hai thể hệ ECB thứ nhất và thứ hai. Thang sau đây được dùng để đánh giá tổn hại thể hệ thứ nhất, điển hình khi ấu trùng trong giai đoạn lột xác thứ 3 đến thứ 4:

- 1- Tổn hại lá không thấy được
- 2- Một lượng nhỏ tổn hại lỗ nhỏ trên một ít lá
- 3- Tổn hại lỗ nhỏ thấy chung trên một số lá
- 4- Một số lá có các lỗ nhỏ và các tổn thương kéo dài
- 5- Một số lá có các tổn thương kéo dài
- 6- Một số lá có các tổn thương kéo dài khoảng 2,5 cm
- 7- Tổn thương kéo dài thấy chung trên khoảng 1/2 số lá
- 8- Tổn thương kéo dài thấy chung trên khoảng 2/3 số lá
- 9- Hầu hết lá có tổn thương kéo dài

Tổn hại do ECB thể hệ thứ hai được đánh giá 3 đến 4 tuần sau khi gây nhiễm nhân tạo hoặc vào cuối chu kỳ đẻ trứng đỉnh điểm. Các phép đo sau đây được tiến hành: số lượng ấu trùng sống/thân, số lượng ấu trùng sống/cuống bắp, số lượng ấu trùng sống/bắp, số lượng đường hầm/thân, chiều dài tổng cộng các đường hầm (cm)/thân, chiều dài tổng cộng các đường hầm (cm)/cuống bắp, số lượng đường hầm/bắp, tổn hại hạt chiều dài tổng cộng các đường hầm (cm)/bắp và % cây bị nhiễm.

Các thử nghiệm CEW nói chung được trồng muộn để tăng mức lây nhiễm tự nhiên. Ăn hại bắp được đánh giá khi ấu trùng CEW trên các cây đối chứng ở giai đoạn tăng trưởng L5-L6. Bắp được đánh giá theo số lượng ấu trùng thu được trên mỗi bắp và chiều dài của đoạn hạt bị ăn thấy được, được đo từ đỉnh bắp đến trung bình hạt thấp nhất bị phá hoại.

Kết quả thử BCW trên cánh đồng được thể hiện trên Bảng 6. Dưới 3% các cây MIR162 và Bt11 X MIR162 bị ấu trùng BCW cắt. Một số lượng đáng kể các cây Bt11 và cây đối chứng bị cắt. Các cây mang kiểu di truyền MIR162 bị BCW ăn hại ít hơn các cây được xử lý thuốc trừ sâu thông thường.

Bảng 6. Mức độ tổn hại thân từ năm thử nghiệm với BCW ở ngày thứ 21 sau khi lây nhiễm. Tổn hại được đo bằng phần trăm số cây bị cắt.

Xử lý	% cây bị cắt
-------	--------------

MIR162	2
Bt11	42
Bt11 X MIR162	3
Thuốc trừ sâu Warrior	12
Đối chứng âm tính	40

Kết quả thử FAW trên cánh đồng được thể hiện trên bảng 7. Ăn hại do FAW được đo theo thang từ 0,01 đến 9. Ăn hại trung bình trong cây lai MIR 162 là rất thấp (<1) và thấp hơn đáng kể tổn hại trung bình quan sát được ở Bt11 và các xử lý thuốc trừ sâu thông thường. Áp lực về côn trùng trong các thử nghiệm này là cao với khoảng 50 đến 100 ấu trùng mới sinh/cây. Bt11 thể hiện một số khả năng bảo vệ khỏi tổn hại, trong khi xử lý thuốc trừ sâu thông thường không có tác dụng bảo vệ và chịu cùng một lượng tổn hại như mẫu đối chứng.

Bảng 7. Đánh giá tổn hại ăn lá từ năm thử nghiệm đối với FAW. Mức độ tổn hại trung bình ở ngày thứ 14 sau khi lây nhiễm đối với mỗi xử lý.

Xử lý	Mức độ tổn hại lá trung bình (0,01-9)
MIR162	0,90
Bt11	2,52
Bt11 X MIR162	0,84
Thuốc trừ sâu Warrior	3,60
Đối chứng âm tính	3,78

Kết quả các thử nghiệm để đánh giá tổn hại do ECB thể hệ thứ nhất thể hiện trên Bảng 8. ECB ăn hại được đánh giá theo thang từ 1 đến 9. Trong các thử nghiệm này, MIR62 được xem là chống lại ít nhất ăn hại do ECB. Bt11 bảo vệ hoàn toàn các cây khỏi ăn hại do ECB. Các cây Bt11 X MIR162 có cùng mức độ bảo vệ như các cây Bt11. Xử lý thuốc trừ sâu thông thường thể hiện khả năng bảo vệ tốt hơn MIR62 nhưng bảo vệ kém hơn đáng kể so với Bt11.

Bảng 8. Thử nghiệm trên cánh đồng về ăn hại lá. Mức độ tổn hại trung bình ở ngày thứ 14 sau lây nhiễm.

Xử lý	Mức độ tổn hại lá trung bình (1-9)
MIR162	2,95
Bt11	1,00
Bt11 X MIR162	1,00
Thuốc trừ sâu Warrior	2,05
Đối chứng âm tính	3,88

Các kết quả tổn hại ECB thể hệ thứ hai được thể hiện trên Bảng 9. Ăn hại được xác định bằng tổng chiều dài đường hầm trong mỗi thân ngô (nếu tìm thấy nhiều hơn một đường hầm, các chiều dài đường hầm được cộng lại). Các mẫu Bt11 và Bt11 x MIR162 thể hiện tính bảo vệ chống đục thân mạnh, trong khi MIR162 đơn lẻ hoặc xử lý thuốc trừ sâu không thể hiện tính bảo vệ chống đục hầm.

Bảng 9. Mức độ tổn hại thân từ bảy thử nghiệm đối với ấu trùng ECB thể hệ thứ hai được xác định bằng chiều dài (cm) đường hầm trong mỗi thân. Các phép đo được tiến hành 3 đến 4 tuần lễ sau lây nhiễm nhân tạo.

Xử lý	Chiều dài hầm trung bình (cm)
MIR162	5,46
Bt11	0,37
Bt11 X MIR162	0,48
Thuốc trừ sâu Warrior	5,06
Đối chứng âm tính	5,04

Các kết quả thử nghiệm để đánh giá tổn hại do CEW thể hiện trên Bảng 10. Ăn hại được đánh giá bằng chiều dài tổn hại hạt trên mỗi bắp, được đo từ đỉnh đầu bắp đến vị trí trung bình hạt bị phá hoại thấp nhất. Tổn hại đáng kể ở bắp được quan sát thấy ở Bt11, thuốc trừ sâu và các mảnh kiểm tra. Bt11 thể hiện cùng mức độ so với mẫu kiểm tra không xử lý và tương đương với mẫu thuốc trừ sâu thông thường. MIR162 và Bt11 X MIR162 thể hiện bảo vệ gần như hoàn toàn các bắp khỏi ấu trùng CEW ăn hại.

Bảng 10. Mức độ tổn hại bắp từ sáu thử nghiệm đối với CEW được đo bằng chiều dài trung bình của độ ăn hại. Các phép đo được thực hiện khi ấu trùng CEW ở các cây kiểm tra đang trong giai đoạn L5-L6.

Xử lý	Tổn hại bắp trung bình (cm)
MIR162	0,17
Bt11	2.24
Bt11 X MIR162	0,02
Thuốc trừ sâu Warrior	2,20
Đối chứng âm tính	3,42

Ví dụ 8. Hiệu quả của MIR162 chống sâu ngài đêm cây đậu tây

Các dòng chuyển gen thương mại hiện hành tạo protein Cry1Ab không thể hiện mức độ chấp nhận được để chống sâu ngài đêm cây đậu tây (WBCW, *Striacosta albicosta*). Bởi vậy, MIR162 đơn lẻ và kết hợp với các kiểu di truyền chuyển gen khác đã được kiểm tra hiệu lực chống WBCW.

Các trứng của WBCW được thu thập từ bướm cái tự nhiên bắt được. Các ấu trùng được nuôi theo chế độ ăn meridic của sâu ngài đêm đen cho đến khi dùng trong thí nghiệm. Các cây ngô được trồng trên đồng. Các cách xử lý sau được thử: MIR162, Bt11, MIR604, MIR162 X Bt11, MIR162 X MIR604, MIR604 X Bt11, Force® (Syngenta, Inc.), thuốc trừ sâu thông thường được áp dụng trong gieo trồng cho một đẳng dòng âm tính và hai đẳng dòng đối chứng âm tính. MIR604 là dòng ngô chuyển gen mới mang gen *cry3A055* mã hoá protein có hoạt tính chống ấu trùng sâu ăn rễ ngô (*Diabrotica spp.*) và đã được bộc lộ trong công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0216970 được công bố ngày 29 tháng 9 năm 2005.

Trong các thí nghiệm, đối với mỗi thử nghiệm và thử nghiệm lặp lại, một đoạn râu xanh và lá bao dài 2 inch được cắt từ bắp của cây ngô trồng trên đồng. Đoạn cuối màu nâu của râu được cắt bỏ và lá bao được loại bỏ. Các đoạn râu khoảng 1,5 inch được đặt riêng biệt trong các cốc nhựa 14 ml. Sau đó, mỗi cốc được cho vào một ấu trùng và bịt kín lại. Một vài giai đoạn khác nhau của ấu trùng từ lột xác lần 3 đến lột xác lần 6 được thử. Các cốc có chứa râu ngô và ấu trùng được giữ ở ngày dài tự nhiên và nhiệt độ phòng trong suốt thời gian thí nghiệm. Sự sống sót của ấu trùng được ghi nhận sau 8 ngày. Các xử lý được lặp lại 4 lần cho mỗi thí nghiệm.

Kết quả của các thí nghiệm WBCW được thể hiện trên bảng 11. Khả năng sống sót của WBCW trên râu ngô từ các mẫu đẳng dòng âm tính và các mẫu xử lý thuốc trừ sâu

thông thường là gần 100%. Khả năng sống sót của ấu trùng WBCW trên các sợi râu Bt11 và MIR604, được thử đơn lẻ hoặc kết hợp trong cùng cây là không khác so với trên đồng âm tính. Khả năng sống sót của ấu trùng WBCW giảm khi ấu trùng được cho ăn râu từ MIR162. Sự kết hợp MIR162 X Bt11 trong cùng cây không làm giảm khả năng sống sót hơn chút nào so với MIR162 đơn lẻ. Tuy nhiên, bất ngờ là khi kiểu di truyền chuyển gen MIR162 ghép với kiểu di truyền chuyển gen MIR604 trong cùng cây, số ấu trùng chết tăng đáng kể so với MIR162 hoặc MIR604 đơn lẻ.

Bảng 11. Phần trăm ($\pm$ SE) sống sót của ấu trùng WBCW trên râu ngô.

Xử lý	Số thí nghiệm						
	1	2	3	4	5	6	7
Bt11	75(25)	75(25)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)
MIR162	25(25)	0(0)	0(0)	50(29)	50(29)	50(29)	0(0)
MIR604					100(0)	100(0)	100(0)
MIR162xBt11	25(25)	25(25)	0(0)	0(0)	25(25)	25(25)	25(25)
MIR162xMIR604					0(0)	25(25)	50(29)
MIR604xBt11							75(25)
Force					100(0)	100(0)	100(0)
Đối chứng âm tính #1	100(0)	75(25)	100(0)	100(0)	75(25)	100(0)	100(0)
Đối chứng âm tính #2	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)	100(0)

Ví dụ 9. Sử dụng điểm chèn dòng MIR162 cho tích hợp có hướng đích trong ngô

Trình tự biên MIR162 được bộc lộ trong SEQ ID NO: 46 và SEQ ID NO: 48 được dùng để tra cứu cơ sở dữ liệu hệ gen ngô. Các tương thích hoàn toàn với cả hai trình tự biên được tìm thấy ở dòng vô tính BAC, CH201-307P5, của nhiễm sắc thể 5 (NCBI Đăng ký No. AC185313) trên Contig 13 (SEQ ID NO: 106). Cụ thể hơn, điểm chèn MIR162 nằm trên nhiễm sắc thể 5 giữa điểm nhận biết phân tử đầu 5', trong trường hợp này là điểm nhận biết *Opie2* (các nucleotit 1680-3338 của SEQ ID NO: 106) và điểm nhận biết phân tử đầu 3' trong trường hợp này là điểm nhận biết gag (các nucleotit 43,275-45,086 của SEQ ID NO: 106). Điều này xác định rằng ADN ngoại lai khi được chèn vào MIR162 đã thay thế cho 58 nucleotit trong ADN hệ gen ngô là các nucleotit 25,455 đến 25,512 của SEQ ID NO: 106 (cũng thể hiện như SEQ ID NO: 107), chúng nằm giữa trình tự biên 5'

(các nucleotit 1-25,454 của SEQ ID NO: 106) và trình tự biên 3' (các nucleotit 25,513-51,328 của SEQ ID NO: 106).

Hiệu suất nông học ổn định của việc chuyển gen của dòng MIR162 qua vài thế hệ trong điều kiện ngoài cánh đồng cho thấy rằng các vùng đã được nhận dạng này nằm quanh điểm chèn MIR162 là các vị trí tốt trong hệ gen để tích hợp có hướng đích các gen chuyển được quan tâm khác. Sự tích hợp có hướng đích như vậy khắc phục được các vấn đề được gọi là "các hiệu ứng vị trí" và rủi ro của việc tạo đột biến trong hệ gen khi tích hợp chuyển gen vào vật chủ. Lợi thế nữa của việc tích hợp có hướng đích như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc giảm số lượng lớn các dòng biến nạp cần được sàng lọc và thử trước khi thu được cây chuyển gen thể hiện được mức biểu hiện chuyển gen mong muốn mà không thể hiện kết quả dị thường do việc chèn không cố ý của gen chuyển vào một điểm quan trọng trong hệ gen của vật chủ. Hơn nữa, tích hợp có hướng đích như vậy cho phép việc kết hợp các thể chuyển gen để tạo ra các dòng cây ưu tú có cả hai gen được hiệu quả hơn.

Khi sử dụng hướng dẫn đã nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể dùng các phương pháp đã được biết đến để hướng đích các axit nucleic ngoại lai mong muốn vào cùng một điểm chèn trên nhiễm sắc thể 5 giống như trong MIR162 hoặc vào một điểm gần sát với điểm chèn trong MIR162. Một phương pháp như vậy đã được bộc lộ trong Công bố Đơn sáng chế Mỹ số 20060253918, trong đơn này được đưa vào toàn bộ để tham khảo. Nói gọn lại, có tới 20 Kb trình tự gen nằm ở vùng biên 5' tới điểm chèn (các nucleotit 5,454 đến 25,454 của SEQ ID NO: 106) và tới 20 Kb trình tự gen nằm ở vùng biên 3' tới điểm chèn (các nucleotit 25,513 đến 45,513 của SEQ OD NO: 106) được dùng để xác định vùng biên của gen hoặc các gen được quan tâm mà chúng có thể được chèn vào vị trí của hệ gen trên nhiễm sắc thể 5 qua tái tổ hợp tương đồng. Các trình tự này còn có thể có vùng biên của các trình tự biên lặp lại của T-ADN như các trình tự lặp lại biên trái (LB) và biên phải (RB) và các trình tự tăng cường khác để nâng cao hiệu quả chuyển T-ADN. Gen hoặc các gen quan tâm có thể được đặt chính xác trong điểm chèn MIR162 hoặc có thể được đặt vào vị trí nào đó trong vùng 20 Kb quanh điểm chèn MIR162 để tạo mức biểu hiện chuyển gen nhất quán mà không có các hiệu quả bất lợi trên cây. Các vectơ ADN có chứa gen hoặc các gen quan tâm và các trình tự biên có thể

được đưa vào các tế bào cây qua một hoặc một số phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không giới hạn biến nạp do *Agrobacterium* là trung gian. Việc chèn vector ADN vào điểm đích MIR162 có thể được tăng cường thêm bởi một hay một số phương pháp, bao gồm nhưng không giới hạn với đồng biểu hiện hoặc điều hòa tăng các gen tăng cường tái tổ hợp hoặc điều hòa giảm các gen ức chế tái tổ hợp nội sinh. Hơn nữa, người ta đã biết rằng sự chia tách các trình tự riêng biệt trong hệ gen có thể được dùng để nâng cao tần xuất tái hợp tương đồng, do đó việc chèn vào điểm chèn MIR162 và các vùng biên của nó có thể được tăng cường bằng cách biểu hiện các enzym cắt trong endonucleaza đặc hiệu trình tự được thiết kế hoặc tự nhiên để chia tách các trình tự này. Bởi vậy, khi sử dụng hướng dẫn được nêu trong đơn này, một axit nucleic ngoại lai bất kỳ có thể được chèn vào nhiễm sắc thể 5 ở ngô tại điểm đích được đặt giữa các nucleotit 25,454 và 45,513 của SEQ ID NO: 106 hoặc điểm đích trong vùng phụ cận với điểm này.

Ví dụ 10. Sử dụng điểm chèn dòng MIR162 và các trình tự biên để ổn định biểu hiện gen

Các trình tự gen nằm ở vùng biên điểm chèn MIR162 cũng có thể được dùng để ổn định biểu hiện của gen hoặc các gen được quan tâm khác khi được chèn như là một gen chuyển vào các vị trí khác của hệ gen trong ngô và các cây trồng khác. Đặc biệt là, có tới 20 Kb của trình tự hệ gen nằm ở vùng biên 5' tới điểm chèn (các nucleotit 5,454 đến 25,454 của SEQ ID NO: 106) và tới 20 Kb trình tự hệ gen nằm ở vùng biên 3' tới điểm chèn (các nucleotit 25,513 đến 45,513 của SEQ OD NO: 106) được dùng làm vùng biên của gen hoặc các gen được quan tâm mà chúng có thể được chèn vào vị trí của hệ gen trên nhiễm sắc thể 5. Các trình tự này còn có thể có vùng biên của các trình tự biên lặp lại của T-ADN như các trình tự lặp lại biên trái (LB) và biên phải (RB) và các trình tự tăng cường khác để nâng cao hiệu quả chuyển T-ADN. Gen hoặc các gen quan tâm có thể được đặt chính xác trong điểm chèn MIR162 hoặc có thể được đặt vào vị trí nào đó trong vùng 20 Kb quanh điểm chèn MIR162 để tạo mức biểu hiện chuyển gen nhất quán. Các vector ADN có chứa gen hoặc các gen quan tâm và các trình tự biên điểm chèn MIR162 có thể được đưa vào các tế bào cây qua một hoặc một số phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, bao gồm nhưng không giới hạn phép biến

nạp tế bào trần, bắn gen và biến nạp do *Agrobacterium* là trung gian. ADN được đưa vào có thể được tích hợp ngẫu nhiên vào hệ gen của cây hoặc cũng có thể có mặt như một đơn vị vật chất di truyền độc lập như nhiễm sắc thể hoặc vi nhiễm sắc thể nhân tạo. Các vector ADN có chứa gen hoặc các gen quan tâm và các trình tự biên điểm chèn MIR162 có thể được đưa vào các tế bào cây. Như vậy, bằng cách bao quanh gen hoặc các gen được quan tâm bằng trình tự biên của điểm chèn MIR162, quá trình biểu hiện của các gen này được ổn định trong cây chủ chuyển gen như cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm giống như ngô.

Nộp lưu

Người nộp đơn đã nộp lưu hạt ngô của dòng MIR162 được bộc lộ trước ngày 23-1-2007 theo Hiệp ước Budapest tại American Type Culture Collection (ATCC), 1801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 dưới ATCC số PTA-8166. Bản lưu sẽ được duy trì ở kho lưu giữ trong suốt thời hạn 30 năm hoặc 5 năm sau ngày yêu cầu cuối cùng hoặc trong suốt thời hạn hiệu lực của sáng chế, tùy theo thời hạn nào là dài hơn và sẽ được thay thế khi cần thiết trong suốt thời hạn này. Người nộp đơn không áp đặt các giới hạn về khả năng cung cấp vật liệu đã nộp lưu từ ATCC; tuy nhiên, người nộp đơn không có quyền khước từ bất cứ hạn chế nào do luật pháp về chuyển giao các vật liệu sinh học hoặc vận chuyển chúng trong thương mại. Người nộp đơn không bỏ qua bất kỳ sự vi phạm đối với quyền của họ đã được cấp theo đơn sáng chế này hoặc theo Luật Bảo hộ Giống cây trồng (7 USC 2321 v.v.).

Mọi xuất bản phẩm và tài liệu sáng chế đã được công bố trong bản mô tả chi tiết này được đưa vào đơn này bằng cách viện dẫn cho cùng một phạm vi cũng giống như mỗi xuất bản phẩm hoặc tài liệu sáng chế riêng biệt được chỉ ra riêng rẽ cũng được đưa vào bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic phân lập được có trình tự nucleotit là duy nhất đối với dòng MIR162, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, và trình tự bổ sung của chúng.
2. Phân tử axit nucleic phân lập được theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit này mã hóa protein có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 2.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Syngenta Participations AG
 Long, NyKoll
 Pulliam, Derrick
 Hart, Hope
 Bottoms, Jeff
 Meghji, Moez
 Que, Qiudeng

<120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC PHÂN LẬP ĐƯỢC CÓ TRÌNH TỰ
 NUCLEOTIT LÀ DUY NHẤT ĐỐI VỚI DÒNG MIR162

<130> 71133WOPCT

<160> SỐ SEQ ID NO: 107

<210> SEQ ID NO 1

<211> ĐỘ DÀI: 2370

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRƯNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự mã hóa vip3Aa20

<400> TRÌNH TỰ: 1

atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgccttcg cgagcttcat cgactacttc	60
aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcgacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac	180
atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccagggcaac	240
ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg	300
aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcgcgtgta cctgcogaag	360
atcaccagca tgctgagcga cgtgattaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag	420
tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc	480
ctgatcaaca gcaccctgac cgagatcacc cgggcctacc agcgcatcaa gtacgtgaac	540
gagaagttcg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc	600
agcccggccg acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc	660
aagaacgacg tggacggctt cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatgggtggc	720
aacaacctgt tcggccgcag cgccctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac	780
gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tcctgatcgt gctgaccgcc	840
ctgcaggccc aggccttcct gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac	900

```

atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg      960
aacatcctgc cgaccctgag caacaccttc agcaaccgga actacgcca ggtgaagggc      1020
agcgacgagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggcttc      1080
gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aaggtgtacg aggccaagct gaagcagaac      1140
taccaggtgg acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg      1200
tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac      1260
gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacc tgcgctacga ggtgaccgcc      1320
aacttctacg acagcagcac cggcgagatc gacctgaaca agaagaagg ggagagcagc      1380
gaggccgagt accgcaccct gagcgcgaaac gacgacggcg tctacatgcc actgggcggtg      1440
atcagcgaga ccttcctgac cccgatcaac ggctttggcc tgcaggccga cgagaacagc      1500
cgcctgatca ccctgacctg taagagctac ctgcgcgagc tgctgctagc caccgacctg      1560
agcaacaagg agaccaagct gatcgtgcc aagcgcggt tcatcagcaa catcgtggag      1620
aacggcagca tcgaggagga caacctggag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac      1680
gtcgaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctgt acgtgcacaa ggacggcggc      1740
atcagccagt tcatcggcga caagctgaag ccgaagacc agtacgtgat ccagtacacc      1800
gtgaagggca agccatcgat tcacctgaag gacgagaaca ccggctacat ccactacgag      1860
gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcaaca agcgcttcac caccggcacc      1920
gacctgaagg gcgtgtacct gatcctgaag agccagaacg gcgacgaggc ctggggcgac      1980
aacttcatca tcctggagat cagcccagc gagaagctgc tgagcccga gctgatcaac      2040
accaacaact ggaccagcac cggcagcacc aacatcagcg gcaacaccct gaccctgtac      2100
cagggcggcc gcggcatcct gaagcagaac ctgcagctgg acagcttcag cacctaccgc      2160
gtgtacttca gcgtgagcgg cgacgccaac gtgcgcatcc gcaactccc cgaggtgctg      2220
ttcgagaaga ggtacatgag cggcgccaag gacgtgagcg agatgttcac caccaagttc      2280
gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggaaca acctgtacgg cgggccgac      2340
gtgcacttct acgacgtgag catcaagtag      2370

```

<210> SEQ ID NO 2

<211> ĐỘ DÀI: 789

<212> LOẠI: PRT

<213> SINH VẬT: Trùng tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Độc tố Vip3Aa

<220> ĐẶC TRƯNG:

<221> TÊN/ CHÌA KHÓA: Đặc trưng hỗn hợp

<222> (1)..(789)

<223> THÔNG TIN KHÁC: Protein Vip3Aa20 tạo ra bởi MIR162

<400> TRÌNH TỰ: 2

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
115 120 125

Ile Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
180 185 190

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
195 200 205

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255

Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr
 275 280 285

Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335

Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350

Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355 360 365

Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380

Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400

Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415

Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430

Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445

Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460

Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480

Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495

Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510

Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525

Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
 530 535 540

Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560

Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575

Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620

Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670

Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly

675

680

685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700

Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720

Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735

Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
 755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
 770 775 780

Asp Val Ser Ile Lys
 785

<210> SEQ ID NO 3

<211> ĐỘ DÀI: 14405

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Plasmid pNOV1300

<400> TRÌNH TỰ: 3

atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgccctgc cgagcttcat cgactacttc	60
aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
gacaccggcg gcgacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac	180
atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccagggcaac	240
ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg	300
aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacacccatgc tgcgcgtgta cctgccgaag	360
atcaccagca tgctgagcga cgtgatgaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag	420
tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc	480
ctgatcaaca gcaccctgac cgagatcacc ccggcctacc agcgcatcaa gtacgtgaac	540
gagaagttcg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc	600

agcccgccg acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc	660
aagaacgacg tggacggctt cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatggtgggc	720
aacaacctgt tcggccgcag cgccctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac	780
gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tctgatcgt gctgaccgcc	840
ctgcaggccc aggccttcct gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac	900
atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg	960
aacatcctgc cgaccctgag caacaccttc agcaaccgca actacgcaa ggtgaagggc	1020
agcgacgagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggcttc	1080
gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aaggtgtacg aggccaagct gaagcagaac	1140
taccaggtag acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg	1200
tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac	1260
gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacc tgcgctacga ggtgaccgcc	1320
aacttctacg acagcagcac cggcgagatc gacctgaaca agaagaagg ggagagcagc	1380
gaggccgagt accgcaccct gagcgcgaa gacgacggcg tctacatgcc actgggcgtg	1440
atcagcgaga ccttcctgac cccgatcaac ggctttggcc tgcaggccga cgagaacagc	1500
cgctgatca cctgacctg taagagctac ctgcgcgagc tgctgctagc caccgacctg	1560
agcaacaagg agaccaagct gatcgtgcca ccgagcggct tcatcagcaa catcgtggag	1620
aacggcagca tcgaggagga caacctggag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac	1680
gtggaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctgt acgtgcacaa ggacggcggc	1740
atcagccagt tcatcggcga caagctgaag ccgaagaccg agtacgtgat ccagtacacc	1800
gtgaagggca agccatcgat tcacctgaag gacgagaaca ccggctacat ccactacgag	1860
gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcaaca agcgcttcac caccggcacc	1920
gacctgaagg gcgtgtacct gatcctgaag agccagaacg gcgacgaggc ctggggcgac	1980
aacttcatca tcttgagat cagcccgagc gagaagctgc tgagcccga gctgatcaac	2040
accaacaact ggaccagcac cggcagcacc aacatcagcg gcaacacct gacctgtac	2100
cagggcggcc gcggcatcct gaagcagaac ctgcagctgg acagcttcag cacctaccgc	2160
gtgtacttca gcgtgagcgg cgacgccaac gtgcgcatcc gcaactcccg cgaggtgctg	2220
ttcgagaaga ggtacatgag cggcgccaag gacgtgagcg agatgttcac caccaagttc	2280
gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggcaaca acctgtacgg cggcccgatc	2340

gtgcacttct acgacgtgag catcaagtag gagctctaga tctgtttctgc acaaagtgga 2400
 gtagtcagtc atcgatcagg aaccagacac cagactttta ttcatacagt gaagtgaagt 2460
 gaagtgcagt gcagtgaagt gctgggtttt gtacaactta gtatgtattt gtatttgtaa 2520
 aatacttcta tcaataaaat ttctaattcc taaaacccaa atccaggggt accagcttgc 2580
 atgcctgcag tgcagcgtga cccggctcgtg cccctctcta gagataatga gcattgcatg 2640
 tctaagttat aaaaaattac cacatatatt ttttgtcaca cttgtttgaa gtgcagttta 2700
 tctatcttta tacatatatt taaactttac tctacgaata atataatcta tagtactaca 2760
 ataatatcag tgtttttagag aatcatataa atgaacagtt agacatggtc taaaggacaa 2820
 ttgagtattt tgacaacagg actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtgttctcct 2880
 ttttttttgc aaatagcttc acctatataa tacttcatcc attttattag tacatccatt 2940
 tagggtttag ggttaatggg ttttatagac taattttttt agtacatcta ttttattcta 3000
 ttttagctc taaattaaga aaactaaaac tctatttttag tttttttatt taataattta 3060
 gatataaaat agaataaaat aaagtgacta aaaattaaac aaataccctt taagaaatta 3120
 aaaaaactaa ggaaacattt ttcttgtttc gagtagataa tgccagcctg ttaaacgccg 3180
 tcgacgagtc taacggacac caaccagcga accagcagcg tcgcgtcggg ccaagcgaag 3240
 cagacggcac ggcattctctg tcgctgcctc tggaccctc tcgagagttc cgctccaccg 3300
 ttggacttgc tccgctgtcg gcatccagaa attgcgtggc ggagcggcag acgtgagccg 3360
 gcacggcagg cggcctcctc ctctctcac ggcaccggca gctacggggg attcctttcc 3420
 caccgctcct tcgctttccc ttctcgccc gccgtaataa atagacaccc cctccacacc 3480
 ctctttcccc aacctcgtgt tgttcggagc gcacacacac acaaccagat ccccccaaa 3540
 tccaccgctc ggcacctcg cttcaaggta cgccgctcgt cctccccccc cccccctc 3600
 taccttctct agatcggcgt tccggtccat ggttagggcc cggtagttct acttctgttc 3660
 atgtttgtgt tagatccgtg tttgtgttag atccgtgctg ctagcgttcg tacacggatg 3720
 cgacctgtac gtcagacag ttctgattgc taacttgcca gtgtttctct ttggggaatc 3780
 ctgggatggc tctagccgtt ccgcagacgg gatcgatttc atgatttttt ttgtttcgtt 3840
 gcataggggt tggtttgccc ttttccttta tttcaatata tgccgtgcac ttgtttgtcg 3900
 ggtcatcttt tcatgctttt ttttgtcttg gttgtgatga tgtggtctgg ttgggcggtc 3960
 gttctagatc ggagtagaat tctgtttcaa actacctggg ggatttatta attttggatc 4020
 tgtatgtgtg tgccatacat attcatagtt acgaattgaa gatgatggat ggaaatatcg 4080
 atctaggata ggtatacatg ttgatgcggg ttttactgat gcatatacag agatgctttt 4140

tggtcgcttg gttgtgatga tgtggtgtgg ttgggcggtc gttcattcgt tctagatcgg	4200
agtagaatac tgtttcaaac tacctggtgt atttattaat tttggaactg tatgtgtgtg	4260
tcatacatct tcatagttac gagtttaaga tggatggaaa tatcgatcta ggataggtat	4320
acatgttgat gtgggtttta ctgatgcata tacatgatgg catatgcagc atctattcat	4380
atgctctaac cttgagtacc tatctattat aataaacaag tatgttttat aattattttg	4440
atcttgatat acttggatga tggcatatgc agcagctata tgtggatttt ttagccctg	4500
ccttcatacg ctattttattt gcttggtact gtttcttttg tcgatgctca ccctgttggt	4560
tggtgttact tctgcagga tccccgatca tgcaaaaact cattaactca gtgcaaaaact	4620
atgcctgggg cagcaaaaacg gcgttgactg aactttatgg tatggaaaat ccgtccagcc	4680
agccgatggc cgagctgtgg atgggcgcac atccgaaaag cagttcacga gtgcagaatg	4740
ccgccggaga tatcgtttca ctgctgatg tgattgagag tgataaatcg actctgctcg	4800
gagaggccgt tgccaaacgc tttggcgaac tgcctttcct gttcaaagta ttatgcgcag	4860
cacagccact ctccattcag gttcatccaa acaaacacaa ttctgaaatc ggttttgcca	4920
aagaaaatgc cgcaggtatc ccgatggatg ccgccgagcg taactataaa gatcctaacc	4980
acaagccgga gctgggttttt gcgctgacgc ctttccttgc gatgaacgcg tttcgtgaat	5040
tttccgagat tgtctcccta ctccagccgg tcgcaggtgc acatccggcg attgctcact	5100
ttttacaaca gcctgatgcc gaacgtttta gcgaactggt cgccagcctg ttgaatatgc	5160
aggggtgaaga aaaatcccg cgcgtggcga ttttaaaatc ggccctcgat agccagcagg	5220
gtgaaccgtg gcaaacgatt cgtttaattt ctgaatttta cccggaagac agcggctctgt	5280
tctccccgt attgctgaat gtggtgaaat tgaaccctgg cgaagcgatg ttctgttctg	5340
ctgaaacacc gcacgcttac ctgcaaggcg tggcgctgga agtgatggca aactccgata	5400
acgtgctgcg tgcggggtctg acgcctaaat acattgatat tccggaactg gttgccaatg	5460
tgaaattcga agccaaaccg gctaaccagt tgttgacca gccggtgaaa caaggtgcag	5520
aactggactt cccgattcca gtggatgatt ttgccttctc gctgcatgac cttagtgata	5580
aagaaaccac cattagccag cagagtgccg ccattttggt ctgctcgaa ggcgatgcaa	5640
cgttggtgaa aggttctcag cagttacagc ttaaaccggg tgaatcagcg tttattgcg	5700
ccaacgaatc accggtgact gtcaaaggcc acggccgttt agcgcgtggt tacaacaagc	5760
tgtaagagct tactgaaaaa attaacatct cttgctaagc tgggagctcg atccgtcgac	5820
ctgcagatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgcgggtc	5880

ttgcatgat	tatcatataa	tttctgttga	attacgttaa	gcatgtaata	attaacatgt	5940
aatgcatgac	gttatttatg	agatggggtt	ttatgattag	agtcccgcaa	ttatacattt	6000
aatacgcat	agaaaacaaa	atatagcgcg	caaactagga	taaattatcg	cgcgcggtgt	6060
catctatgtt	actagatccc	cgggtctaga	caattcagta	cattaaaaac	gtccgcaatg	6120
tgttattaag	ttgtctaagc	gtcaatttgt	ttacaccaca	atatatcctg	ccaccagcca	6180
gccaacagct	ccccgaccgg	cagctcggca	caaaatcacc	actcgataca	ggcagcccat	6240
cagtccggga	cggcgtcagc	gggagagccg	ttgtaaggcg	gcagactttg	ctcatgttac	6300
cgatgctatt	cggaagaacg	gcaactaagc	tgccgggttt	gaaacacgga	tgatctcgcg	6360
gagggtagca	tgttgattgt	aacgatgaca	gagcgttgct	gcctgtgatc	aaatatcatc	6420
tccctcgcat	agatccgaat	tatcagcctt	cttattcatt	tctcgcttaa	ccgtgacagg	6480
ctgtcgatct	tgagaactat	gccgacataa	taggaaatcg	ctggataaag	ccgctgagga	6540
agctgagtgg	cgctatttct	ttagaagtga	acgttgacga	tcgtcgaccg	taccccgatg	6600
aattaattcg	gacgtacgtt	ctgaacacag	ctggatactt	acttgggcga	ttgtcataca	6660
tgacatcaac	aatgtaccgg	tttgtgtaac	cgtctcttgg	aggttcgtat	gacactagtg	6720
gttcccctca	gcttgcgact	agatgttgag	gcctaacatt	ttattagaga	gcaggctagt	6780
tgcttagata	catgatcttc	aggccgttat	ctgtcagggc	aagcgaaaat	tggccattta	6840
tgacgaccaa	tgccccgcag	aagctcccat	ctttgccgcc	atagacgcgg	cgccccctt	6900
ttgggggtgta	gaacatcctt	ttgccagatg	tggaaaagaa	gttcggttgc	ccattgttgg	6960
caatgacgta	gtagccggcg	aaagtgcgag	accattttgc	gctatatata	agcctacgat	7020
ttccgttgcg	actattgtcg	taattggatg	aactattatc	gtagttgctc	tcagagttgt	7080
cgtaatttga	tggactattg	tcgtaattgc	ttatggagtt	gtcgtagttg	cttgagagaaa	7140
tgtcgtagtt	ggatggggag	tagtcatagg	gaagacgagc	ttcatccact	aaaacaattg	7200
gcaggtcagc	aagtgcctgc	cccgatgcca	tcgcaagtac	gaggcttaga	accaccttca	7260
acagatcgcg	catagtcttc	cccagctctc	taacgcttga	gttaagccgc	gcgcggaagc	7320
ggcgtcggct	tgaacgaatt	gttagacatt	atttgccgac	taccttggtg	atctgcctt	7380
tcacgtagtg	aacaaattct	tccaactgat	ctgcgcgcga	ggccaagcga	tcttcttgtc	7440
caagataagc	ctgcctagct	tcaagtatga	cgggctgata	ctgggcccgc	aggcgctcca	7500
ttgcccagtc	ggcagcgaca	tccttcggcg	cgattttgcc	ggttactgcg	ctgtacccaaa	7560
tgccgggacaa	cgtaagcact	acatttcgct	catcgccagc	ccagtcgggc	ggcgagttcc	7620
atagcgtaa	ggtttcattt	agcgccotcaa	atagatcctg	ttcaggaacc	ggatcaaaga	7680

gttcctccgc	cgctggacct	accaaggcaa	cgctatgttc	tcttgctttt	gtcagcaaga	7740
tagccagatc	aatgtcgatc	gtggctggct	cgaagatacc	tgcaagaatg	tcattgcgct	7800
gccattctcc	aaattgcagt	tcgcgcttag	ctggataacg	ccacggaatg	atgtcgtcgt	7860
gcacaacaat	ggtgacttct	acagcgcgga	gaatctcgtc	ctctccaggg	gaagccgaag	7920
tttccaaaag	gtcgttgatc	aaagctcgcc	gcgttgtttc	atcaagcctt	acggtcaccg	7980
taaccagcaa	atcaatatca	ctgtgtggct	tcaggccgcc	atccactgcg	gagccgtaca	8040
aatgtacggc	cagcaacgtc	ggttcgagat	ggcgctcgat	gacgccaact	acctctgata	8100
gttgagtcga	tacttcggcg	atcacgcgtt	ccctcatgat	gtttaactcc	tgaattaagc	8160
cgcgccgcga	agcgggtgctg	gcttgaatga	attgttaggc	gtcatcctgt	gctcccgaga	8220
accagtacca	gtacatcgct	gtttcgttcg	agacttgagg	tctagtttta	tacgtgaaca	8280
ggatcaatgcc	gccgagagta	aagccacatt	ttgcgtacaa	attgcaggca	ggtacattgt	8340
tcgtttgtgt	ctctaactgt	atgccaagga	gctgtctgct	tagtgccac	tttttcgcaa	8400
attcgatgag	actgtgctgcg	actcctttgc	ctcgggtgctg	gtgcgacaca	acaatgtggt	8460
cgatagaggc	tagatcgttc	catgttgagt	tgagttcaat	cttcccgaca	agctcttggt	8520
cgatgaatgc	gccatagcaa	gcagagtctt	catcagagtc	atcatccgag	atgtaatcct	8580
tccggtaggg	gtcacactt	ctggtagata	gttcaaagcc	ttggtcggat	aggtgcacat	8640
cgaacacttc	acgaacaatg	aaatggttct	cagcatccaa	tgtttccgcc	acctgctcag	8700
ggatcaccga	aatcttcata	tgacgcctaa	cgcctggcac	agcggatcgc	aaacctggcg	8760
cggcttttgg	cacaaaaggc	gtgacagggt	tgcaaatccg	ttgctgccac	ttgttaaccc	8820
ttttgccaga	tttggttaact	ataatttatg	ttagaggcga	agtcttgggt	aaaaactggc	8880
ctaaaattgc	tggggatttc	aggaaagtaa	acatcacctt	ccggctcgat	gtctattgta	8940
gatatatgta	gtgtatctac	ttgatcgggg	gatctgctgc	ctcgcgcgtt	tcggtgatga	9000
cggtgaaaac	ctctgacaca	tgacgctccc	ggagacggtc	acagcttgtc	tgtaagcgga	9060
tgccgggagc	agacaagccc	gtcagggcgc	gtcagcgggt	gttggcgggt	gtcggggcgc	9120
agccatgacc	cagtcacgta	gcgatagcgg	agtgtatact	ggcttaacta	tgcggcacatca	9180
gagcagattg	tactgagagt	gcaccatatg	cgggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	9240
agaaaatacc	gcacagggcg	ctcttcgcgt	tcctcgctca	ctgactcgct	gcgctcggtc	9300
gttcggctgc	ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	9360
tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	9420

```

aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 9480
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 9540
ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 9600
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 9660
agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 9720
gaccgctgcg ctttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaa acacgactta 9780
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg aggcgggtgct 9840
acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 9900
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 9960
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 10020
aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 10080
aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 10140
ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 10200
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 10260
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggaggggctt accatctggc 10320
cccagtgtcg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 10380
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc 10440
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgccg 10500
aacgttgttg ccattgctgc aggggggggg gggggggggt tccattgttc attccacgga 10560
caaaaacaga gaaaggaaac gacagaggcc aaaaagctcg ctttcagcac ctgtcgtttc 10620
ctttcttttc agaggggtatt ttaaataaaa acattaagtt atgacgaaga agaacggaaa 10680
cgccttaaac cggaaaattt tcataaatag cgaaaacccg cgaggtcgcc gccccgtaac 10740
ctgtcggatc accggaaagg acccgtaaag tgataatgat tatcatctac atatcacaac 10800
gtgctgggag gccatcaaac cacgtcaaat aatcaattat gacgcaggta tcgtattaat 10860
tgatctgcat caacttaacg taaaaacaac ttcagacaat acaaatcagc gacactgaat 10920
acggggcaac ctcatgtccc ccccccccc cccctgcag gcatcggtgt gtcacgctcg 10980
tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 11040
cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag 11100
ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 11160
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 11220

```

tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaacac gggataatac cgcgccacat 11280
 agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 11340
 atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccctctc gtgcacccaa ctgatcttca 11400
 gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 11460
 aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat 11520
 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 11580
 aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 11640
 gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 11700
 cttcaagaat tggtcgacga tcttgctgog ttoggatatt ttogtggagt tcccgccaca 11760
 gacccggtt gaaggcgaga tccagcaact cgcgccagat catcctgtga cggaactttg 11820
 gcgcgtgatg actggccagg acgtcgccg aaagagcgac aagcagatca cgcttttcga 11880
 cagcgtcgga tttgcgatcg aggatttttc ggcgtgogc tacgtccgog accgcgttga 11940
 gggatcaagc cacagcagcc cactcgacct tctagccgac ccagacgagc caagggatct 12000
 ttttggaatg ctgctccgtc gtcaggcttt ccgacgtttg ggtggttgaa cagaagtcatt 12060
 tatcgacgg aatgccaagc actcccgagg ggaaccctgt ggttggtcatg cacatacaaa 12120
 tggacgaacg gataaacctt ttcacgccct tttaaatata cgattattct aataaacgct 12180
 cttttctctt aggtttaccg gccaatatat cctgtcaaac actgatagtt taaactgaag 12240
 gcgggaaacg acaatctgat catgagcgga gaattaaggg agtcacgtta tgacccccgc 12300
 cgatgacgog ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac gttgaaggag 12360
 ccactcagca agctggtaca agcttgcatg cctgcagtgc agcgtgaccc ggtcgtgccc 12420
 ctctctagag ataatgagca ttgcatgtct aagttataaa aaattaccac atattttttt 12480
 tgtcacactt gtttgaagtg cagtttatct atctttatac atatatttaa actttactct 12540
 acgaataata taatctatag tactacaata atatcagtgt tttagagaat catataaatg 12600
 aacagttaga catggtctaa aggacaattg agtattttga caacaggact ctacagtttt 12660
 atcttttttag tgtgcatgtg ttctcctttt tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac 12720
 ttcatccatt ttattagtag atccatttag ggtttagggt taatggtttt tatagactaa 12780
 tttttttagt acatctattt tattctattt tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct 12840
 attttagttt ttttatttaa taatttagat ataaaataga ataaaataaa gtgactaaaa 12900
 attaaacaaa taccctttta gaaattaaaa aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag 12960

tagataatgc cagcctgtta aacgcgctcg acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc 13020
 agcagcgtcg cgtcggggcca agcgaagcag acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg 13080
 acccctctcg agagttccgc tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt 13140
 gcgtggcgga gcggcagacg tgagccggca cggcaggcgg cctcctcctc ctctcacggc 13200
 accggcagct acgggggatt cctttccac cgctccttcg ctttcccttc ctgcccggc 13260
 gtaataaata gacacccct ccacaccctc tttccccaac ctctgtttgt tcggagcgca 13320
 cacacacaca accagatctc ccccaaattc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc 13380
 cgctcgtcct ccccccccc cctctctac cttctctaga tcggcggttc ggtccatggt 13440
 tagggcccgg tagttctact tctgttcagt tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc 13500
 cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa 13560
 cttgccagt tttctctttg gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat 13620
 cgatttcagt attttttttg tttcgttgca tagggtttg tttgcccttt tcctttattt 13680
 caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt catcttttca tgcttttttt tgtcttggtt 13740
 gtgatgatgt ggtctggttg ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact 13800
 acctggtgga tttattaatt ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg 13860
 aattgaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcggggtt 13920
 tactgatgca tatacagaga tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtgggtg 13980
 ggcggtcgtt cattcgttct agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt 14040
 tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag ttttaagatg 14100
 atggaaatat cgatctagga taggtataca tgttgatgtg gggtttactg atgcatatac 14160
 atgatggcat atgcagcatc tattcatatg ctctaaccct gagtacctat ctattataat 14220
 aaacaagtat gttttataat tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc 14280
 agctatatgt ggattttttt agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggactgtt 14340
 tcttttgctg atgtcaccc tgttggttg tgttacttct gcaggctgac tctagaggat 14400
 ccacc 14405

<210> SEQ ID NO 4

<211> ĐỘ DÀI: 21

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi TAQMAN vip3Aa - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 4
caccttcagc aacccgaact a 21

<210> SEQ ID NO 5
<211> ĐỘ DÀI: 22
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi ngược TAQMAN vip3Aa - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 5
gcttagcctc cacgatcatc tt 22

<210> SEQ ID NO 6
<211> ĐỘ DÀI: 23
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tu nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Phân tử dò TAQMAN vip3Aa - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 6
gtcctcgtcg ctgcccttca cct 23

<210> SEQ ID NO 7
<211> ĐỘ DÀI: 18
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi TAQMAN pmi - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 7
ccgggtgaat cagcgttt 18

<210> SEQ ID NO 8
<211> ĐỘ DÀI: 18
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi ngược TAQMAN pmi - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 8
gccgtggcct ttgacagt 18

<210> SEQ ID NO 9
<211> ĐỘ DÀI: 20
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Mẫu dò phân tử TAQMAN pmi - tổng hợp hóa học

<400> TRÌNH TỰ: 9
tgccgccaac gaatcaccgg

20

<210> SEQ ID NO 10 /
<211> ĐỘ DÀI: 21
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi TAQMAN ZmADH-267 - tổng hợp hoá học dùng cho

<400> TRÌNH TỰ: 10
gaacgtgtgt tgggtttgca t

21

<210> SEQ ID NO 11
<211> ĐỘ DÀI: 20
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi ngược TAQMAN ZmADH-267 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 11
tccagcaatc cttgcacctt

20

<210> SEQ ID NO 12
<211> ĐỘ DÀI: 24
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Mẫu dò phân tử TAQMAN ZmADH-267 - tổng hợp nhân tạo

<400> TRÌNH TỰ: 12
tgcagcctaa ccatgocgag ggta

24

<210> SEQ ID NO 13
<211> ĐỘ DÀI: 2370
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Mẫu dò phân tử vip3Aa20 tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 13
atgaacaaga acaacaccaa gctgagcacc cgcgccctgc cgagcttcat cgactacttc 60
aacggcatct acggcttcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc 120
gacaccggcg ggcacctgac cctggacgag atcctgaaga accagcagct gctgaacgac 180
atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agcctgaacg acctgatcgc ccagggcaac 240
ctgaacaccg agctgagcaa ggagatcctt aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctg 300

aacgacgtga acaacaagct ggacgccatc aacaccatgc tgcgcgtgta cctgccgaag	360
atcaccagca tgctgagcga cgtgatgaag cagaactacg ccctgagcct gcagatcgag	420
tacctgagca agcagctgca ggagatcagc gacaagctgg acatcatcaa cgtgaacgtc	480
ctgatcaaca gcaccctgac cgagatcacc ccggcctacc agcgcaccaa gtacgtgaac	540
gagaagttcg aagagctgac cttcgccacc gagaccagca gcaaggtgaa gaaggacggc	600
agcccggccg acatcctgga cgagctgacc gagctgaccg agctggcgaa gagcgtgacc	660
aagaacgacg tggacggctt cgagttctac ctgaacacct tccacgacgt gatggtgggc	720
aacaacctgt tcggccgcag cgccctgaag accgccagcg agctgatcac caaggagaac	780
gtgaagacca gcggcagcga ggtgggcaac gtgtacaact tcctgatcgt gctgaccgcc	840
ctgcaggccc aggccttcct gaccctgacc acctgtcgca agctgctggg cctggccgac	900
atcgactaca ccagcatcat gaacgagcac ttgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg	960
aacatcctgc cgaccctgag caacaccttc agcaaccga actacgcaa ggtgaagggc	1020
agcgacgagg acgccaagat gatcgtggag gctaagccgg gccacgcgtt gatcggcttc	1080
gagatcagca acgacagcat caccgtgctg aagggtgtacg aggccaagct gaagcagaac	1140
taccaggtgg acaaggacag cttgagcgag gtgatctacg gcgacatgga caagctgctg	1200
tgtccggacc agagcgagca aatctactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac	1260
gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacc tcgcgtacga ggtgaccgcc	1320
aacttctacg acagcagcac cggcgagatc gacctgaaca agaagaagg ggagagcagc	1380
gaggccgagt accgcaccct gagcgcgaaac gacgacggcg tctacatgcc actgggcgtg	1440
atcagcgaga ccttcctgac ccgatcaac ggctttggcc tgcaggccga cgagaacagc	1500
cgctgatca ccctgacctg taagagctac ctgcgcgagc tgctgctagc caccgacctg	1560
agcaacaagg agaccaagct gatcgtgcc aagagcggt tcatcagcaa catcgtggag	1620
aacggcagca tcgaggagga caacctggag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac	1680
gtggaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctgt acgtgcacaa ggacggcggc	1740
atcagccagt tcatcggcga caagctgaag ccgaagacc agtacgtgat ccagtacacc	1800
gtgaagggca agccatcgat tcacctgaag gacgagaaca ccggctacat ccactacgag	1860
gacaccaaca acaacctgga ggactaccag accatcaaca agcgcttcac caccggcacc	1920
gacctgaagg gcgtgtacct gatcctgaag agccagaacg gcgacgaggc ctggggcgac	1980
aacttcatca tcctggagat cagcccgagc gagaagctgc tgagcccgga gctgatcaac	2040

accaacaact ggaccagcac cggcagcacc aacatcagcg gcaacaccct gaccctgtac 2100
 cagggcgggc gcggcatcct gaagcagaac ctgcagctgg acagcttcag cacctaccgc 2160
 gtgtacttca gcgtgagcgg cgacgccaac gtgcgcatcc gcaactcccg cgaggtgctg 2220
 ttcgagaaga ggtacatgag cggcgccaag gacgtgagcg agatgttcac caccaagtcc 2280
 gagaaggaca acttctacat cgagctgagc cagggcaaca acctgtacgg cggcccgatc 2340
 gtgcacttct acgacgtgag catcaagtag 2370

<210> SEQ ID NO 14

<211> ĐỘ DÀI: 1176

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Mẫu dò phân tử pmi - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 14

atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaac tatgcctggg gcagcaaaac ggcgttgact 60
 gaacttttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
 catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
 gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttggcgaa 240
 ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
 aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360
 gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420
 cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttcgcgaga ttgtctccct actccagccg 480
 gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
 agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600
 atttttaaatt cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
 tctgaatttt acccggaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa 720
 ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780
 gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
 tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900
 ttgttgaccc agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960
 tttgccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
 gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttggtgga aaggttctca gcagttacag 1080
 cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140

cacggccgtt tagcgctgt ttacaacaag ctgtaa

1176

<210> SEQ ID NO 15

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi MOV3Aa-01-5'- tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 15

atgaacaaga acaacaccaa

20

<210> SEQ ID NO 16

<211> ĐỘ DÀI: 22

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi MOV3Aa-01-3'-tổng hợp hóa học

<400> TRÌNH TỰ: 16

ctacttgatg ctcacgtcgt ag

22

<210> SEQ ID NO 17

<211> ĐỘ DÀI: 18

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 17

acgagcagaa ccaggtgc

18

<210> SEQ ID NO 18

<211> ĐỘ DÀI: 18

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 18

ggtgaagaag gacggcag

18

<210> SEQ ID NO 19

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 19
acctgtcgca agctgctggg 20

<210> SEQ ID NO 20
<211> ĐỘ DÀI: 18
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 20
tggacaagct gctgtgtc 18

<210> SEQ ID NO 21
<211> ĐỘ DÀI: 19
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 21
tgcaggccga cgagaacag 19

<210> SEQ ID NO 22
<211> ĐỘ DÀI: 19
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 22
tgatccagta caccgtgaa 19

<210> SEQ ID NO 23
<211> ĐỘ DÀI: 18
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 23
accctgaccc tgtaccag 18

<210> SEQ ID NO 24
<211> ĐỘ DÀI: 18
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 24
gtgttgccgc tgatgttg

18

<210> SEQ ID NO 25

<211> ĐỘ DÀI: 18

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 25
cgtactcggc cttcggct

18

<210> SEQ ID NO 26

<211> ĐỘ DÀI: 18

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 26
ctgcaggcca aagccgtt

18

<210> SEQ ID NO 27

<211> ĐỘ DÀI: 18

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 27
tcgccgtaga tcacctcg

18

<210> SEQ ID NO 28

<211> ĐỘ DÀI: 18

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 28
gcttgcgaca ggtggtca

18

<210> SEQ ID NO 29

<211> ĐỘ DÀI: 19

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 29
 ttgctgctgg tctcggtgg 19

<210> SEQ ID NO 30
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 30
 cgttggcgat ctttaaggat 19

<210> SEQ ID NO 31
 <211> ĐỘ DÀI: 17
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 31
 gcaagccatc gattcac 17

<210> SEQ ID NO 32
 <211> ĐỘ DÀI: 17
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 32
 gcaacaccct gaccctg 17

<210> SEQ ID NO 33
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 33
 tctacgacgt gagcatcaag 20

<210> SEQ ID NO 34
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 34
 gtagaagtgc acgatcggg 19

<210> SEQ ID NO 35
 <211> ĐỘ DÀI: 17
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 35
 cgggtgctggt ccagttg 17

<210> SEQ ID NO 36
 <211> ĐỘ DÀI: 21
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi 162INSERT-F2 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 36
 acaccaatga tgcaaatagg c 21

<210> SEQ ID NO 37
 <211> ĐỘ DÀI: 25
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi VIP_R4- tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 37
 gaaggtgttc aggtagaact cgaag 25

<210> SEQ ID NO 38
 <211> ĐỘ DÀI: 2946
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn khuếch đại vip3Aa20 5'- tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 38
 acaccaatga tgcaaatagg ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg aatcatgtca 60
 ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatac atgagcggag aattaaggga 120
 gtcacgttat gacccccgcc gatgacgcgg gacaagccgt ttacgtttg gaactgacag 180
 aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gctggtacaa gcttgcatgc ctgcagtgca 240

gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcatgtcta agttataaaa 300
 aattaccaca tattttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta tctttataca 360
 tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa tatcagtgtt 420
 ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaaa ggacaattga gtattttgac 480
 aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt ttttgcaaat 540
 agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg gtttaggggtt 600
 aatggttttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt agcctctaaa 660
 ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata taaaatagaa 720
 taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaaat accctttaag aaattaaaaa aactaaggaa 780
 acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga cgagtctaac 840
 ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggccaa gcgaagcaga cggcacggca 900
 tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg acttgctccg 960
 ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac ggcaggcggc 1020
 ctctctctcc tctcacggca cggcagcta cgggggattc ctttcccacc gtccttctgc 1080
 tttcccttcc tcgcccgcgc taataaatag acaccccctc cacaccctct tttcccaacc 1140
 tcgtgttggt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca cccgtcggca 1200
 cctccgcttc aaggtacgcc gctcgtcctc cccccccccc cctctctacc ttctctagat 1260
 cggcgttccg gtccatggtt agggcccggg agttctactt ctgttcatgt ttgtgttaga 1320
 tccgtgtttg tgtagatcc gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac ctgtacgtca 1380
 gacacgttct gattgctaac ttgccagtgt ttctctttgg ggaatcctgg gatggctcta 1440
 gccgttccgc agacgggatc gatttcatga ttttttttgt ttcgttgcat agggtttggt 1500
 ttgccctttt cttttatttc aatatatgcc gtgcacttgt ttgtcgggtc atcttttcat 1560
 gctttttttt gtcttggttg tgatgatgtg gtctgggttg gcggtcgttc tagatcggag 1620
 tagaattctg tttcaaacta cctggtggat ttattaattt tggatctgta tgtgtgtgcc 1680
 atacatattc atagttacga attgaagatg atggatggaa atatcgatct aggataggta 1740
 tacatgttga tgcgggtttt actgatgcat atacagagat gctttttgtt cgcttggttg 1800
 tgatgatgtg gtgtgggttg gcggtcgttc attcgttcta gatcggagta gaatactgtt 1860
 tcaaactacc tgggtgattt attaatattt gaactgtatg tgtgtgtcat acatcttcat 1920
 agttacgagt ttaagatgga tggaaatatc gatctaggat aggtatacat gttgatgtgg 1980

```

gttttactga tgcatataca tgatggcata tgcagcatct attcatatgc tctaacccttg 2040
agtacctatc tattataata aacaagtatg ttttataatt attttgatct tgatatactt 2100
ggatgatggc atatgcagca gctatatgtg gattttttta gccctgcctt catacgctat 2160
ttatttgctt ggtactgttt cttttgtcga tgctcaccct gttgtttggt gttacttctg 2220
caggtcgact ctagaggatc caccatgaac aagaacaaca ccaagctgag caccgcgcc 2280
ctgccgagct tcatcgacta cttcaacggc atctacggct tcgccaccgg catcaaggac 2340
atcatgaaca tgatcttcaa gaccgacacc ggcggcgacc tgaccctgga cgagatcctg 2400
aagaaccagc agctgctgaa cgacatcagc ggcaagctgg acggcgtgaa cggcagcctg 2460
aacgacctga tcgcccaggg caacctgaac accgagctga gcaaggagat ccttaagatc 2520
gccaacgagc agaaccaggt gctgaacgac gtgaacaaca agctggacgc catcaacacc 2580
atgctgcgcg tgtacctgcc gaagatcacc agcatgctga gcgacgtgat taagcagaac 2640
tacgccctga gcctgcagat cgagtacctg agcaagcagc tgcaggagat cagcgacaag 2700
ctggacatca tcaacgtgaa cgtcctgatc aacagcacc ctgaccgagat caccgcggcc 2760
taccagcgca tcaagtacgt gaacgagaag ttccaagagc tgaccttcgc caccgagacc 2820
agcagcaagg tgaagaagga cggcagcccg gccgacatcc tggacgagct gaccgagctg 2880
accgagctgg cgaagagcgt gaccaagaac gacgtggacg gcttcgagtt ctacctgaac 2940
accttc 2946

```

<210> SEQ ID NO 39

<211> ĐỘ DÀI: 23

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi CJB179 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 39

atgcaaata gctgggaata gtc

23

<210> SEQ ID NO 40

<211> ĐỘ DÀI: 21

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi ngược CTRB3116 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 40

gtaccagctt gctgagtggc t

21

<210> SEQ ID NO 41
 <211> ĐỘ DÀI: 209
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn khuếch đại CJB134/179 5'- tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 41
 atgcaaatag gctgggaata gtctgtctaa tagtttgagt gaatcatgtc actgatagtt 60
 taaactgaag gcgggaaacg acaatctgat catgagcgga gaattaaggg agtcacgtta 120
 tgacccccgc cgatgacgcg ggacaagccg ttttacgttt ggaactgaca gaaccgcaac 180
 gttgaaggag ccactcagca agctggtac 209

<210> SEQ ID NO 42
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi VIP-F3 - tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 42
 ggtgctgttc gagaagaggt 20

<210> SEQ ID NO 43
 <211> ĐỘ DÀI: 23
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi PMI_REV1 - tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 43
 cgatttatca ctctcaatca cat 23

<210> SEQ ID NO 44
 <211> ĐỘ DÀI: 2577
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn khuếch đại vip3Aa20 3'- tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 44
 ggtgctgttc gagaagaggt acatgagcgg cgccaaggac gtgagcgaga tgttcaccac 60
 caagttcgag aaggacaact tctacatcga gctgagccag ggcaacaacc tgtaaggcgg 120
 cccgatcgtg cacttctacg acgtgagcat caagtaggag ctctagatct gttctgcaca 180
 aagtggagta gtcagtcacg gatcaggaac cagacaccag acttttattc atacagtga 240

gtgaagtgaa gtgcagtgca gtgagttgct ggTTTTtGta caacttagta tgtatttGta	300
tttGtaaaat acttctatca ataaaatttc taattcctaa aaccaaatac caggggtacc	360
agcttgcattg cctgcagtgC agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca	420
ttgcatgtct aagttataaa aaattaccac atattttttt tgtcacactt gtttgaagtG	480
cagtttatct atctttatac atatatTTaa actttactct acgaataata taatctatag	540
tactacaata atatcagtgt tttagagaat catataaatG aacagttaga catgggtctaa	600
aggacaattg agtattttga caacaggact ctacagtttt atcttttttag tgtgcattgtg	660
ttctcctttt tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac ttcatccatt ttattagtac	720
atccatttag ggtttagggT taatggtttt tatagactaa tttttttagt acatctattt	780
tattctattt tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct attttagttt ttttatttaa	840
taatttagat ataaaataga ataaaataaa gtgactaaaa attaaacaaa taccctttta	900
gaaattaaaa aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag tagataatgc cagcctgtta	960
aacgccgtcg acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc agcagcgtcg cgtcggggcca	1020
agcgaagcag acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg acccctctcg agagttccgc	1080
tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt gcgtggcgga gcggcagacg	1140
tgagccggca cggcaggcgg cctcctctc ctctcacggc accggcagct acgggggatt	1200
cctttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctgcgccgcc gtaataaata gacacccct	1260
ccacaccctc tttccccaac ctctgtgttg tctggagcgca cacacacaca accagatctc	1320
ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtagcg cgctcgtcct ccccccccc	1380
ccctctctac cttctctaga tctggcttcc ggtccatggt tagggcccgg tagttctact	1440
tctgttcattg tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac	1500
acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtG tttctctttg	1560
gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcattg attttttttg	1620
tttcgttgca tagggtttgg tttgcccttt tcctttattt caatatatgc cgtgcacttg	1680
tttgtcgggt catcttttca tgcttttttt tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctggttg	1740
ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt	1800
ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga	1860
aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga	1920
tgcttttttg tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt cattcgttct	1980
agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat	2040

```

gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag ttttaagatgg atggaaatat cgatctagga 2100
taggtatata tggttgatgtg gggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc 2160
tattcatatg ctctaacctt gaggacatct ctattataat aaacaagtat gttttataat 2220
tatttttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt 2280
agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tgggtactgtt tcttttgctg atgctcaccc 2340
tggtgttttg tggttacttct gcagggatcc ccgatcatgc aaaaactcat taactcagtg 2400
caaaaactatg cctggggcag caaaacggcg ttgactgaac tttatgggat ggaaaatccg 2460
tccagccagc cgatggccga gctgtggatg ggcgcacatc cgaaaagcag ttcacgagtg 2520
cagaatgccg ccggagatat cgtttctactg cgtgatgtga ttgagagtga taaatcg 2577

```

<210> SEQ ID NO 45
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự nối 3' nằm giữa hệ gen ngô và ADN chèn

<400> TRÌNH TỰ: 45
 tgaatcatgt cactgatagt 20

<210> SEQ ID NO 46
 <211> ĐỘ DÀI: 1088
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự biên 5'

<220> ĐẶC TRUNG:
 <221> TÊN/ CHÌA KHÓA: Đặc trưng hỗn hợp
 <222> (1)..(236)
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự biên 5'

<400> TRÌNH TỰ: 46
 tcctgtgttg ttggaacaga cttctgtctc ttctggtgat cataaatatt taaatgaacc 60
 agttgtgttg gaaaatgttg ttttcttttg tctctagact ggaaagcgga gttctcgtca 120
 acacggttct ttcaactagg gatgaaagtg gtaatccgaa ttgttagtac aaatttaata 180
 ttttaaaata gatatgtata aaattttatg ttgatctttt ttatgttatc aagcacatta 240
 gtataaatta gtataaatat gaataaaata ttacataaaa tgttttatgt attatttggg 300
 ccctacaaca taaatagttg aaaaaattac taaatttgtt ttcgaatcta tatcgaagtt 360

tatatctatt atttaagaaa aatataggat gaaaagggtt atcttttatg aatctttaca 420
agctggatct tataaacaag aaaataaatt tatattgtag attttatatc ctatttattc 480
gcaatcaaag aaaagcgact aaaaaactga ttaccgagta aatactgttt ccaaccgttt 540
tcgtccctac tatcaacgcc ttctcccaac cgcagtcgat ctgtccgtct gtatcaggcg 600
cagcggcacc cctgctgttc gactatctag accatagaat attttaggta tacaataatt 660
ttagttccac gctagaacat tttagttaga ataataacaa gatttgctat tgatgtagga 720
ctcgcccgtc actgtctaaa aaagcattct gtcggtctta ttcttttaggc atcagcgggt 780
gtactatctc atttttccta tcatattcct cagtactctg ttaagtataa atgggtctatt 840
ttacatgatg aactaataaa actaattaag gatcctaact ttttgtgaag gtaatttgga 900
tcattatgca ttaccatcct acgtatacct gctgcagcag catctgcgta agcacagcct 960
agatatatgc ttctgtgtgg actgaaagga gactttgttt atcaattagt atactcccaa 1020
aaaactgatg acaccaatga tgcaaataag ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg 1080
aatcatgt 1088

<210> SEQ ID NO 47

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự nối liền với đầu 3' nằm giữa ADN chèn và hệ gen
ngô

<400> TRÌNH TỰ: 47

aaacgtccgc catggtctga

20

<210> SEQ ID NO 48

<211> ĐỘ DÀI: 1189

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự biên 3'

<400> TRÌNH TỰ: 48

catggtctga aggcaacaga taaggcatac tgggccttgt ggtagttgtt ttactgggcc 60
tttttgtatg atctataaaa ttactggga tcaaccgga gaggaatggc agcagatgca 120
gtccccaggg tcctccgtcg ccgcctgagc acccggcacc cgcgctgaac cggagaggga 180
cgcgcgagcg ccgtgcagct ggtgcggagg gggctgtggc agatgaggat gagacgcgta 240
cgtgggtggg aaggccagca ggccaccggg tcttcgtcca gcccggcgcg agtggacagg 300

```

actagagatg gcaacgggta caaacccgct gggttttacc gtcccaaacc cgtaccgctg      360
aaaaatatct atgccatta aaaaaccgct acccatgacg gggttgagat tttgcccaaa      420
cccgtagcca tcgggttaac gggtagccat gggtagccg cgggtttcat ctccaatata      480
cctgttcttc tcataatcaa taagtatcgt aatgattaat gatatcatga tccaaaatct      540
atgtaatgaa caacgagttc atgatttggt ataaaaatta ttagtagaga gaatgaaata      600
caaataataa gttgtataat taagtacact tgcactaagt tatccatcca tcacatatat      660
aacgctagta aaaactataa tatcaagcaa gcaacactct caccgactac tgatacatc      720
accaattgat aaaaaatatg aagtaaataa ggaataacaa gtttggtggt cggtttataaa      780
ataaaatgac aatatgcact aggtttggtc gggtttaaaa aaccacggg ttcacgggtt      840
tgggtactat aggaacaaac ccgtaccat aaaccattg ggtacagatt tatgccggtt      900
aacaaccca tgggtatgaa aattgacca aacctatacc ctaatggggg aaaaacccat      960
cgggtttcgg atttcgggta ccattgcc a tctctagaca ggacaacctc ggccggtcct      1020
gtatgtaggc caccagcatc ggccagttgg tacatccagc cggggtcagg tcacttttac      1080
tcgtctcaat cagacaatca ccgtccacca acgaacgcca acgttggtcac ttgtcaggtc      1140
gggtgagact tgtatTTTTT tttgtcctcc gtaaaaatcg gttcaccag      1189

```

<210> SEQ ID NO 49

<211> ĐỘ DÀI: 10579

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn chèn Vip3Aa20 dòng MIR162 và trình tự biên

<220> ĐẶC TRUNG:

<221> TÊN/ CHÌA KHÓA: Đặc trưng hỗn hợp

<222> (1)..(1088)

<223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự biên 5' của dòng MIR162

<400> TRÌNH TỰ: 49

```

tcctgtgttg ttggaacaga cttctgtctc ttctggtgat cataaatatt taaatgaacc      60
agttgtgttg gaaaatgttg ttttcttttg tctctagact ggaaagcgga gttctcgtea      120
acacggttct ttcaactagg gatgaaagtg gtaatccgaa ttgttagtac aaatttaata      180
ttttaaaata gatatgtata aaattttatg ttgatctttt ttatgttatc aagcacatta      240
gtataaatta gtataaatat gaataaaata ttacataaaa tgttttatgt attatttggt      300
ccctacaaca taaatagttg aaaaaattac taaatttggt ttcgaatcta tatcgaagtt      360
tatatctatt atttaagaaa aatataggat gaaaagggtt atcttttatg aatctttaca      420

```

```

agctggatct tataaacaag aaaataaatt tatattgtag attttatatc ctattttattc 480
gcaatcaaag aaaagcgact aaaaaactga ttaccgagta aatactgttt ccaaccgttt 540
tcgtccctac tatcaacgcc ttctcccaac cgcagtcgat ctgtccgtct gtatcaggcg 600
cagcggcacc cctgctgttc gactatctag accatagaat attttaggta tacaataatt 660
ttagttccac gctagaacat tttagttaga ataataacaa gatttgctat tgatgtagga 720
ctcgcccgtc actgtctaaa aaagcattct gtcggtctta ttctttaggc atcagcgggt 780
gtactatctc atttttccta tcatattcct cagtactctg ttaagtataa atgggtctatt 840
ttacatgatg aactaataaa actaattaag gatcctaact ttttgtgaag gtaatttgga 900
tcattatgca ttaccatcct acgtatacct gctgcagcag catctgcgta agcacagcct 960
agatatatgc ttctgtgtgg actgaaagga gactttgttt atcaattagt atactcccaa 1020
aaaactgatg acaccaatga tgcaaataag ctgggaatag tctgtctaata agtttgagtg 1080
aatcatgtca ctgatagttt aaactgaagg cgggaaacga caatctgatc atgagcggag 1140
aattaaggga gtcacgttat gacccccgcc gatgacgcgg gacaagccgt tttacgtttg 1200
gaactgacag aaccgcaacg ttgaaggagc cactcagcaa gctggtacaa gcttgcatgc 1260
ctgcagtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcatgtcta 1320
agttataaaa aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 1380
tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 1440
tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atgggtctaaa ggacaattga 1500
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcatgtgt tctccttttt 1560
ttttgcaaata agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg 1620
gtttagggtt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt 1680
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaata aatttagata 1740
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaata accctttaag aaattaaaaa 1800
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga 1860
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcggggcaa gcgaagcaga 1920
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg 1980
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcgag cggcagacgt gagccggcac 2040
ggcaggcggc ctctcctcc tctcacggca ccggcagcta cgggggattc ctttcccacc 2100
gtccttcgc tttcccttcc tcgcccgcgc taataaatag acacccctc cacaccctct 2160

```

ttccccaacc	tcgtgttggt	cggagcgcac	acacacacaa	ccagatctcc	cccaaatacca	2220
cccgtcggca	cctccgcttc	aaggtacgcc	gctcgtcctc	ccccccccc	cctctctacc	2280
ttctctagat	cggcgttccg	gtccatgggt	agggcccggt	agttctactt	ctgttcatgt	2340
ttgtgttaga	tccgtgtttg	tgtagatcc	gtgctgctag	cgttcgtaca	cggatgcgac	2400
ctgtacgtca	gacacgttct	gattgctaac	ttgccagtgt	ttctctttgg	ggaatcctgg	2460
gatggctcta	gccgttccgc	agacgggatc	gatttcatga	ttttttttgt	ttcgttgcac	2520
agggtttggt	ttgccctttt	cctttatttc	aatatatgcc	gtgcacttgt	ttgtcgggtc	2580
atcttttcat	gctttttttt	gtcttggttg	tgatgatgtg	gtctggttgg	gcggtcgttc	2640
tagatcggag	tagaattctg	tttcaaacta	cctggtggat	ttattaattt	tggatctgta	2700
tgtgtgtgcc	atacatattc	atagttacga	attgaagatg	atggatggaa	atatcgatct	2760
aggataggta	tacatgttga	tgccgggtttt	actgatgcac	atacagagat	gctttttgtt	2820
cgcttggttg	tgatgatgtg	gtgtggttgg	gcggtcgttc	attcgttcta	gatcggagta	2880
gaatactgtt	tcaaactacc	tggtgtattt	attaattttg	gaactgtatg	tgtgtgtcat	2940
acatcttcat	agttacgagt	ttaagatgga	tggaaatata	gatctaggat	aggtatacat	3000
gttgatgtgg	gttttactga	tgcatataca	tgatggcata	tgacgacatc	attcatatgc	3060
tctaaccttg	agtacctata	tattataata	aacaagtatg	ttttataatt	attttgatct	3120
tgatatactt	ggatgatggc	atatgcagca	gctatatgtg	gattttttta	gccctgcctt	3180
catacgctat	ttatttgctt	ggtactgttt	cttttgtcga	tgctcaccct	gttgtttggt	3240
gttacttctg	caggtcgcact	ctagaggatc	caccatgaac	aagaacaaca	ccaagctgag	3300
caccgcgcgc	ctgccgagct	tcatcgacta	cttcaacggc	atctacggct	tcgccaccgg	3360
catcaaggac	atcatgaaca	tgatcttcaa	gaccgacacc	ggcggcgacc	tgaccctgga	3420
cgagatcctg	aagaaccagc	agctgctgaa	cgacatcagc	ggcaagctgg	acggcgtgaa	3480
cggcagcctg	aacgacctga	tcgccaggg	caacctgaac	accgagctga	gcaaggagat	3540
ccttaagatc	gccaacgagc	agaaccaggt	gctgaacgac	gtgaacaaca	agctggacgc	3600
catcaacacc	atgctgcgcg	tgtacctgcc	gaagatcacc	agcatgctga	gcgacgtgat	3660
gaagcagaac	tacgccctga	gcctgcagat	cgagtacctg	agcaagcagc	tgacggagat	3720
cagcgacaag	ctggacatca	tcaacgtgaa	cgtcctgata	aacagcacc	tgaccgagat	3780
caccccggcc	taccagcgca	tcaagtacgt	gaacgagaag	ttcgaagagc	tgaccttcgc	3840
caccgagacc	agcagcaagg	tgaagaagga	cggcagcccc	gccgacatcc	tggacgagct	3900
gaccgagctg	accgagctgg	cgaagagcgt	gaccaagaac	gacgtggacg	gcttcgagtt	3960

ctacctgaac accttccacg acgtgatggg gggcaacaac ctgttcggcc gcagcgccct 4020
 gaagaccgcc agcgagctga tcaccaagga gaacgtgaag accagcggca gcgaggtggg 4080
 caacgtgtac aacttctga tcgtgctgac cgccctgcag gccaggcct tcctgaccct 4140
 gaccacctgt cgcaagctgc tgggcctggc cgacatcgac tacaccagca tcatgaacga 4200
 gcacttgaac aaggagaagg aggagtccg cgtgaacatc ctgccgacc tgagcaaac 4260
 cttcagcaac ccgaactacg ccaaggtgaa gggcagcgac gaggacgcca agatgatcgt 4320
 ggaggctaag ccgggccacg cgttgatcgg cttcgagatc agcaacgaca gcatcacctgt 4380
 gctgaagggtg tacgaggcca agctgaagca gaactaccag gtggacaagg acagcttgag 4440
 cgaggtgatc tacggcgaca tggacaagct gctgtgtccg gaccagagcg agcaaata 4500
 ctacaccaac aacatcgtgt tcccgaacga gtacgtgatc accaagatcg acttcacaa 4560
 gaagatgaag accctgcgt acgaggtgac cgccaacttc tacgacagca gcaccggcga 4620
 gatcgacctg aacaagaaga aggtggagag cagcgaggcc gagtaccgca ccctgagcgc 4680
 gaacgacgac ggcgtctaca tgccactggg cgtgatcagc gagaccttc tgaccccgat 4740
 caacggcttt ggctgcagg ccgacgagaa cagccgctg atcacctga cctgtaagag 4800
 ctacctgcgc gagctgctgc tagccaccga cctgagcaac aaggagacca agctgatcgt 4860
 gccaccgagc ggcttcatca gcaacatcgt ggagaacggc agcatcgagg aggacaacct 4920
 ggagccgtgg aaggccaaca acaagaacgc ctacgtggac cacaccggcg gcgtgaacgg 4980
 caccaaggcc ctgtacgtgc acaaggacgg cggcatcagc cagtccatcg gcgacaagct 5040
 gaagccgaag accgagtagc tgatccagta caccgtgaag ggcaagccat cgattcacct 5100
 gaaggacgag aacaccggct acatccacta cgaggacacc aacaacaacc tggaggacta 5160
 ccagaccatc aacaagcgt tcaccaccgg caccgacctg aaggcggtgt acctgatcct 5220
 gaagagccag aacggcgacg aggcctgggg cgacaacttc atcatcctgg agatcagccc 5280
 gagcgagaag ctgctgagcc cggagctgat caacaccaac aactggacca gcaccggcag 5340
 caccaacatc agcggcaaca ccctgacct gtaccagggc ggccgaggca tcctgaagca 5400
 gaacctgcag ctggacagct tcagcaccta ccgctgtac ttcagcgtga gcggcgacgc 5460
 caacgtgcgc atccgcaact ccgcgaggt gctgttcgag aagaggtaca tgagcggcgc 5520
 caaggacgtg agcgagatgt tcaccaccaa gttcgagaag gacaacttct acatcgagct 5580
 gagccagggc aacaacctgt acggcggccc gatcgtgcac ttctacgacg tgagcatcaa 5640
 gtaggagctc tagatctgtt ctgcacaaag tggagtagtc agtcatcgat caggaaccag 5700

acaccagact	tttattcata	cagtgaagtg	aagtgaagtg	cagtgcagtg	agttgctggt	5760
ttttgtacaa	cttagtatgt	atttgtatgt	gtaaaatact	tctatcaata	aaatttctaa	5820
ttcctaaaac	caaaatccag	gggtaccagc	ttgcatgcct	gcagtgcagc	gtgacccggt	5880
cgtgcccctc	tctagagata	atgagcattg	catgtctaa	ttataaaaaa	ttaccacata	5940
ttttttttgt	cacacttggt	tgaagtgcag	tttatctatc	tttatacata	tattttaaaact	6000
ttactctacg	aataatataa	tctatagtac	tacaataata	tcagtgtttt	agagaatcat	6060
ataaatgaac	agttagacat	ggtctaaagg	acaattgagt	attttgacaa	caggactcta	6120
cagttttatc	tttttagtgt	gcatgtgttc	tccttttttt	ttgcaaata	cttcacctat	6180
ataatacttc	atccatttta	ttagtacatc	catttagggg	ttaggggtta	tggtttttat	6240
agactaattt	tttttagtaca	tctattttat	tctattttag	cctctaaatt	aagaaaacta	6300
aaactctatt	ttagtttttt	tatttaataa	tttagatata	aaatagaata	aaataaagtg	6360
actaaaaatt	aaacaaatac	cctttaagaa	attaaaaaaa	ctaaggaaac	atttttcttg	6420
tttcgagtag	ataatgccag	cctgttaaac	gccgtcgacg	agtctaacgg	acaccaacca	6480
gcgaaccagc	agcgtcgcg	cgggccaaag	gaagcagacg	gcacggcatc	tctgtcgctg	6540
cctctggacc	cctctcgaga	gttccgctcc	accgttggac	ttgctccgct	gtcggcatcc	6600
agaaattgcg	tggcggagcg	gcagacgtga	gcgggcacgg	caggcggoct	cctcctcctc	6660
tcacggcacc	ggcagctacg	ggggattcct	ttcccaccgc	tccttcgctt	tccttcctc	6720
gccgcgcgta	ataaatagac	acccctcca	cacctcttt	ccccaacctc	gtgttggtcg	6780
gagcgcacac	acacacaacc	agatctcccc	caaatccacc	cgtcggcacc	tcgcttcaa	6840
ggtacgcgc	tcgtcctccc	cccccccccc	tctctacctt	ctctagatcg	gcgttcgggt	6900
ccatggtttag	ggcccggtag	ttctacttct	gttcatgttt	gtgttagatc	cgtgtttgtg	6960
ttagatccgt	gctgctagcg	ttcgtacacg	gatgcgacct	gtacgtcaga	cacgttctga	7020
ttgctaactt	gccagtgttt	ctctttgggg	aatcctggga	tggtcttagc	cgttcgcag	7080
acgggatcga	tttcatgatt	ttttttgttt	cgttgcatag	ggtttggttt	gcccttttcc	7140
tttatttcaa	tatatgccgt	gcacttggtt	gtcgggtcat	cttttcatgc	ttttttttgt	7200
cttggttggtg	atgatgtggt	ctggttgggc	ggtcgttcta	gatcggagta	gaattctggt	7260
tcaaactacc	tggtggattt	attaattttg	gatctgtatg	tgtgtgccat	acatatccat	7320
agttacgaat	tgaagatgat	ggatggaaat	atcgatctag	gataggtata	catgttgatg	7380
cgggttttac	tgatgcatat	acagagatgc	tttttggtcg	cttggttggtg	atgatgtggt	7440
gtggttgggc	ggtcgttcat	tcgttctaga	tcggagtaga	atactgtttc	aaactacctg	7500

gtgtatattat taatttttga actgtatgtg tgtgtcatatc atcttcatag ttacgagttt 7560
 aagatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt tgatgtgggt tttactgatg 7620
 catatacatg atggcatatg cagcatctat tcatatgctc taaccttgag tacctatcta 7680
 ttataataaa caagtatgtt ttataattat tttgatcttg atatacttg atgatggcat 7740
 atgcagcagc tatatgtgga ttttttttagc cctgccttca tacgctattt atttgcttg 7800
 tactgtttct tttgtcgatg ctccacctgt tgtttggtgt tacttctgca gggatccccg 7860
 atcatgcaaa aactcattaa ctcatgcaa aactatgcct ggggcagcaa aacggcggtg 7920
 actgaacttt atggtatgga aaatccgtcc agccagccga tggccgagct gtggatgggc 7980
 gcacatccga aaagcagttc acgagtgcag aatgccgccg gagatatcgt ttcactgcgt 8040
 gatgtgattg agagtataaa atcgactctg ctcgagagag ccgttgccaa acgctttggc 8100
 gaactgcctt tcctgttcaa agtattatgc gcagcacagc cactctccat tcaggttcat 8160
 ccaaacaaac acaattctga aatcggtttt gccaaagaaa atgccgcagg tatcccgatg 8220
 gatgccgccg agcgtaacta taaagatcct aaccacaagc cggagctggt ttttgcgctg 8280
 acgcctttcc ttgcgatgaa cgcgtttcgt gaattttccg agattgtctc cctactccag 8340
 ccggtcgcag gtgcacatcc ggcgattgct cactttttac aacagcctga tgccgaacgt 8400
 ttaagcgaac tgttcgccag cctgttgaat atgcaggggtg aagaaaaatc ccgcgcgctg 8460
 gcgattttta aatcggccct cgatagccag caggggtgaac cgtggcaaac gattcgttta 8520
 atttctgaat tttacccgga agacagcggg ctgttctccc cgctattgct gaatgtgggtg 8580
 aaattgaacc ctggcgaagc gatgttctctg ttcgctgaaa caccgcacgc ttacctgcaa 8640
 ggcgtggcgc tggaagtgat ggcaaaactcc gataacgtgc tgcgtgcggg tctgacgcct 8700
 aaatacattg atattccgga actggttgcc aatgtgaaat tcgaagccaa accggctaac 8760
 cagttgttga cccagccggt gaaacaaggc gcagaactgg acttcccgat tccagtggat 8820
 gattttgcct tctcgctgca tgaccttagt gataaagaaa ccaccattag ccagcagagt 8880
 gccgccattt tgttctgcgt cgaaggcgat gcaacgttgt ggaaagggtc tcagcagtta 8940
 cagcttaaacc cgggtgaatc agcgtttatt gccccaacg aatcaccggt gactgtcaaa 9000
 ggccacggcc gtttagcgcg tgtttacaac aagctgtaag agcttactga aaaaattaac 9060
 atctcttgct aagctgggag ctcgatccgt cgacctgcag atcgttcaaa catttggtgaa 9120
 taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgca tgattatcat ataatttctg 9180
 ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg 9240

```

gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaatatag 9300
cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tggtactaga tccccgggtc 9360
tagacaattc agtacattaa aaacgtccgc catgggtctga aggcaacaga taaggcatac 9420
tgggccttgt ggtagttggt ttactgggcc tttttgtatg atctataaaa ttcactggga 9480
tcaacccgga gaggaatggc agcagatgca gtccccaggg tcctccgtcg ccgcctgagc 9540
acccggcacc cgcgctgaac cggagaggga cgcgcgagc ccgtgcagct ggtgcggagg 9600
gggctgtggc agatgaggat gagacgcgta cgtgggtggg aaggccagca ggccaccggg 9660
tcttcgtcca gcccggcgcg agtggacagg actagagatg gcaacggtta caaacccgct 9720
gggttttacc gtcccaaacc cgtaccctg aaaaatatct atgccatta aaaaaccgct 9780
acccatgacg ggtttgagat ttgccc aaa cccgtaccca tcgggttaac ggttaccat 9840
gggttaccg cgggtttcat ctccaatata cctgttcttc tcataatcaa taagtatcgt 9900
aatgattaat gatatcatga tccaaaatct atgtaatgaa caacgagttc atgatttgg 9960
ataaaaatta ttagtagaga gaatgaaata caaataataa gttgtataat taagtacct 10020
tgactaagt tatccatcca tcacatatat aacgctagta aaaactataa tatcaagcaa 10080
gcaacactct caccgactac tgatacttc accaattgat aaaaaatatg aagtaaataa 10140
ggaataacaa gtttgttgtt cgtttataaa ataaaatgac aatatgcact aggtttggtc 10200
gggtttaaaa aaccacggg ttcacgggtt tgggtactat aggaacaaac ccgtaccat 10260
aaaccattg ggtacagatt tatgccgtt aacaaaccca tgggtatgaa aattgaccca 10320
aacctatacc ctaatgggtt aaaaacccat cgggtttcgg atttcgggta ccattgcc 10380
tctctagaca ggacaacctc ggccggtcct gtatgtaggc caccagcatc ggccagttgg 10440
tacatccagc cggggtcagg tcacttttac tcgtctcaat cagacaatca ccgtccacca 10500
acgaacgcca acgttgtcac ttgtcaggtc ggttgagact tgtatTTTTT tttgtcctcc 10560
gtaaaaatcg gttcaccag 10579

```

<210> SEQ ID NO 50

<211> ĐỘ DÀI: 23

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi FE1002 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 50

cgtagctccc ttaattctcc gct

23

<210> SEQ ID NO 51
 <211> ĐỘ DÀI: 24
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi FE1003 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 51
 gatcagattg tcgtttcccg cctt 24

<210> SEQ ID NO 52
 <211> ĐỘ DÀI: 24
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi FE1004 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 52
 gattgtcggt tccccgccttc agtt 24

<210> SEQ ID NO 53
 <211> ĐỘ DÀI: 27
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi 162_DW_Conf3 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 53
 cctgtgttgt tggaacagac ttctgtc 27

<210> SEQ ID NO 54
 <211> ĐỘ DÀI: 26
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi FE0900 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 54
 ggctccttca acgttgcggt tctgtc 26

<210> SEQ ID NO 55
 <211> ĐỘ DÀI: 1230
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn khuếch đại PCR 5'- tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 55
 cctgtgttgt tggaacagac ttctgtctct tctggtgatc ataaatattt aaatgaacca 60

```

gttgtgttg aaaatgttgt tttcttttgt ctctagactg gaaagcggag ttctcgtcaa 120
cacggttctt tcaactaggg atgaaagtgg taatccgaat tgtagtagaca aatttaatat 180
tttaaaatag atatgtataa aattttatgt tgatcttttt tatgttatca agcacattag 240
tataaattag tataaatatg aataaaatat tacataaaat gttttatgta ttatttggtc 300
cctacaacat aaatagttga aaaaattact aaatttgttt tcgaatctat atcgaagttt 360
atatctatta tttaagaaaa atataggatg aaaagggtta tcttttatga atctttacaa 420
gctggatctt ataaacaaga aaataaattt atattgtaga ttttatatcc tattttattcg 480
caatcaaaga aaagcgacta aaaaactgat taccgagtaa atactgtttc caaccgtttt 540
cgtccctact atcaacgcct tctcccaacc gcagtcgacg tgtccgtctg tatcagggcg 600
agcggcaccg ctgctgttcg actatctaga ccatagaata ttttaggtat acaataattt 660
tagttccacg ctagaacatt ttagttagaa taataacaag atttgctatt gatgtaggac 720
tcgcccgtca ctgtctaaaa aagcattctg tcggtcttat tctttaggca tcagcgggtg 780
tactatctca tttttcctat catattcctc agtactctgt taagtataaa tggctctatt 840
tacatgatga actaataaaa ctaattaagg atcctaactt tttgtgaagg taatttgat 900
cattatgcat taccatccta cgtatacctg ctgcagcagc atctgcgtaa gcacagccta 960
gatatatgct tctgtgtgga ctgaaaggag actttgttta tcaattagta tactcccaaa 1020
aaactgatga caccaatgat gcaaataggc tgggaatagt ctgtctaata gtttgagtga 1080
atcatgtcac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga 1140
attaagggag tcacgttatg acccccgcgg atgacgcggg acaagccgtt ttacgtttgg 1200
aactgacaga accgcaacgt tgaaggagcc 1230

```

<210> SEQ ID NO 56

<211> ĐỘ DÀI: 28

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRƯNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi 162_GW_3_F1 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 56

tctcttgcta agctgggagc tcgatccg

28

<210> SEQ ID NO 57

<211> ĐỘ DÀI: 28

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRƯNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi 162_GW_3_F2 tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 57

aagattgaat cctgttgccg gtcttgccg

28

<210> SEQ ID NO 58

<211> ĐỘ DÀI: 24

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRƯNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi 162_3'GW_R1 - tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 58

ctgggtgaacc gattttttacg gagg

24

<210> SEQ ID NO 59

<211> ĐỘ DÀI: 1518

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRƯNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn khuếch đại 3'PCR - Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 59

tctcttgcta agctgggagc tcgatccgctc gacctgcaga tcgttcaaac atttggcaat 60

aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgccgat gattatcata taatttctgt 120

tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg 180

tttttatgat tagagtcccc caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc 240

gcgcgaaacta ggataaatta tcgcgcgcgcg tgatcatctat gttactagat ccccggtctc 300

agacaattca gtacattaaa aacgtccgcc atggctctgaa ggcaacagat aaggcatact 360

gggccttggtg gtagttgttt tactgggcct ttttgatga tctataaaat tcactgggat 420

caaccgagag aggaatggca gcagatgcag tcccagggc cctccgtcgc cgcctgagca 480

cccggcaccg gcgctgaacc ggagaggac gcgcggacgc cgtgcagctg gtgcggaggg 540

ggctgtggca gatgaggatg agacgcgtac gtggctggga aggccagcag gccaccgggt 600

cttcgtccag cccggcgca gtggacagga ctagagatgg caacggttac aaaccgctg 660

ggttttaccg tcccaaacc gtaccgtga aaaatatcta tgccattaa aaaaccgta 720

cccatgacgg gtttgagatt ttgccaaaac ccgtacccat cgggttaacg ggtacccatg 780

ggttaccg gcggtttcatc tccaatatac ctgttcttct cataatcaat aagtatcgta 840

atgattaatg atatcatgat ccaaaatcta tgtaatgaac aacgagttca tgatttggtg 900

taaaaattat tagtagagag aatgaaatac aaataataag ttgtataatt aagtgcctt 960

gcactaagtt atccatccat cacatatata acgctagtaa aaactataat atcaagcaag 1020
 caacactctc accgactact gatacattca ccaattgata aaaaatatga agtaaataag 1080
 gaataacaag tttgttggtc gtttataaaa taaaatgaca atatgcacta ggtttggtcg 1140
 ggtttaaaaa acccacgggt tcacgggttt ggggtactata ggaacaaacc cgtacccata 1200
 aacccattgg gtacagattt atgcccggtt acaaaccat ggggtatgaaa attgacccaa 1260
 acctataccc taatggggta aaaaccatc ggggttcgga tttcgggtac ccattgccat 1320
 ctctagacag gacaacctcg gccggtcctg tatgtaggcc accagcatcg gccagttggt 1380
 acatccagcc ggggtcaggt cacttttact cgtctcaatc agacaatcac cgtccaccaa 1440
 cgaacgcaa cgttgtcact tgtcaggctg gttgagactt gtattttttt ttgtcctccg 1500
 taaaaatcgg ttcaccag 1518

<210> SEQ ID NO 60
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 60
 ttcacgggag actttatctg 20

<210> SEQ ID NO 61
 <211> ĐỘ DÀI: 17
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 61
 ccgattcatt aatgcag 17

<210> SEQ ID NO 62
 <211> ĐỘ DÀI: 17
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 62
 acgtaaaacg gcttgtc 17

<210> SEQ ID NO 63
 <211> ĐỘ DÀI: 17

<212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 63
 gtttaaactg aaggcgg 17

<210> SEQ ID NO 64
 <211> ĐỘ DÀI: 22
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 64
 aataatatca ctctgtacat cc 22

<210> SEQ ID NO 65
 <211> ĐỘ DÀI: 15
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 65
 gttgtaaaac gacgg 15

<210> SEQ ID NO 66
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 66
 taggcacccc aggcttta 18

<210> SEQ ID NO 67
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 67
 aattgaattt agcggccg 18

<210> SEQ ID NO 68

<211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRƯNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 68
 ggtccctaca acataaatag 20

<210> SEQ ID NO 69
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRƯNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 69
 ttcgtcccta ctatcaacgc 20

<210> SEQ ID NO 70
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRƯNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 70
 ctttaggcac cagcgggt 18

<210> SEQ ID NO 71
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRƯNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 71
 agcatctgcg taagcaca 18

<210> SEQ ID NO 72
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRƯNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 72
 ctgatgacac caatgatgc 19

<210> SEQ ID NO 73
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 73
 gatcagattg tegtttccc 19

<210> SEQ ID NO 74
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 74
 gcatcattgg tgtcatcag 19

<210> SEQ ID NO 75
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 75
 tgtgcttacg cagatgct 18

<210> SEQ ID NO 76
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 76
 acccgctgat gcctaaag 18

<210> SEQ ID NO 77
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 77
 gcgttgatag tagggacgaa 20

<210> SEQ ID NO 78
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 78
 ctatttatgt tgtaggacc 20

<210> SEQ ID NO 79
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 79
 ctagactgga aagcgag 18

<210> SEQ ID NO 80
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 80
 ccactttcat ccctagttg 19

<210> SEQ ID NO 81
 <211> ĐỘ DÀI: 17
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 81
 gattgaatcc tggtgcc 17

<210> SEQ ID NO 82
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 82
 tctcataaat aacgtcatgc 20

<210> SEQ ID NO 83
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 83
 tctgtggata accgtattac 20

<210> SEQ ID NO 84
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 84
 agtaacatag atgacaccgc 20

<210> SEQ ID NO 85
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 85
 ccagtgtgct ggaattcg 18

<210> SEQ ID NO 86
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 86
 ccagtgtgat ggatatctgc 20

<210> SEQ ID NO 87
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

 <220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

 <400> TRÌNH TỰ: 87

ccagtgtgct ggaattcg

18

<210> SEQ ID NO 88

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 88

ccagtgtgat ggatatctgc

20

<210> SEQ ID NO 89

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 89

gtgtgctgga attcgccctt

20

<210> SEQ ID NO 90

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 90

tatctgcaga attcgccctt

20

<210> SEQ ID NO 91

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 91

gtgtgctgga attcgccctt

20

<210> SEQ ID NO 92

<211> ĐỘ DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 92
 tatctgcaga attcgccctt 20

<210> SEQ ID NO 93
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 93
 gtgtgctgga attcgccctt 20

<210> SEQ ID NO 94
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 94
 tatctgcaga attcgccctt 20

<210> SEQ ID NO 95
 <211> ĐỘ DÀI: 20
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 95
 gtgtgctgga attcgccctt 20

<210> SEQ ID NO 96
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 96
 ggtcttgca tgattatc 18

<210> SEQ ID NO 97
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 97
 gagaggaatg gcagcaga 18

<210> SEQ ID NO 98
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 98
 catgacgggt ttgagatt 18

<210> SEQ ID NO 99
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 99
 aatctcaaac ccgtcatg 18

<210> SEQ ID NO 100
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 100
 tctgctgccca ttctcttc 18

<210> SEQ ID NO 101
 <211> ĐỘ DÀI: 19
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
 <223> THÔNG TIN KHÁC: Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 101
 gatcaacccg gagaggaat 19

<210> SEQ ID NO 102
 <211> ĐỘ DÀI: 18
 <212> LOẠI: ADN
 <213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi mang trình tự b05104h - Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 102
ccatgacggg tttgagat

18

<210> SEQ ID NO 103
<211> ĐỘ DÀI: 20
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi mang trình tự b05105c - Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 103
caaccgacct gacaagtgc

20

<210> SEQ ID NO 104
<211> ĐỘ DÀI: 18
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi mang trình tự b05105e - Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 104
atctcaaacc cgtcatgg

18

<210> SEQ ID NO 105
<211> ĐỘ DÀI: 19
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Trình tự nhân tạo

<220> ĐẶC TRUNG:
<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi mang trình tự b05105f - Tổng hợp hoá học

<400> TRÌNH TỰ: 105
attcctctcc ggggtgatc

19

<210> SEQ ID NO 106
<211> ĐỘ DÀI: 51328
<212> LOẠI: ADN
<213> SINH VẬT: Zea mays

<220> ĐẶC TRUNG:
<221> TÊN/ CHÌA KHÓA: Đặc trưng hỗn hợp
<222> (1680)..(3338)
<223> THÔNG TIN KHÁC: chỉ thị opie2

<220> ĐẶC TRUNG:
<221> TÊN/ CHÌA KHÓA: Đặc trưng hỗn hợp
<222> (25455)..(25512)
<223> THÔNG TIN KHÁC: Trình tự hệ gen ngô được thay bằng ADN là của MIR162.

<220> ĐẶC TRUNG:

<221> TÊN/ CHÌA KHÓA: Đặc trưng hỗn hợp

<222> (43275)..(45086)

<223> THÔNG TIN KHÁC: chỉ thị gag

<400> TRÌNH TỰ: 106

```

agatctagag attcgtcatt tgtagaaagg atagaaagggt gattgctagg aagttagggg      60
caaaatgcaa ggggtgataaa acttgcatTTT ggatccctaa ggaaattgtg actaaccttg      120
taggacccaa caagagttgg gtacctaagt cccaagccta aatttgcctt gcaggtttat      180
gcatccgggg gttcaagctg gattattgat agcggatgca caaacatat gacggggggag      240
aagaagatgt tcacctccta tgtcaagaat aaggattccc aagattcaat tatattcggt      300
gatgggaatc aaggcaagggt aaaagggtta ggtaaaattg caatttctaa tgagcactcc      360
atatctaattg tgTTTTtagt agagtctctc agatataatt tgctatctgt tagtcaatta      420
tgcaacatgg ggtataactg tctatttacc aatgtagatg tgtctgtctt tagaagaagt      480
gatggttcac tagcttttaa ggggtgtatta gacggcaaac tttatttagt tgattttgca      540
aaagaagagg ccggtctaga tgcattgctta atagctaaga ctagcatggg ctggctgtgg      600
catcgccgct tagcacatgt ggggatgaag aaccttcaca agcttctaaa gggagaacac      660
gtgatagggt tgactaatgt gcaattcgaa aaagatagac cttgtgcagc ttgtcaagca      720
gggaaacagg tgggaagcgc tcatcacacc aaaaatgtga tgacaacatc aagaccctg      780
gagctgctac atatggacct cttcggaccc gtcgcctatc tgagcatagg aggaagtaag      840
tatgggtctag ttatcggtga tgacttttcc cgcttcactt ggggtgttctt tttgcaggat      900
aaatctgaaa cccaagggac cctcaagcgc ttctcagga gatctcaaaa tgagtttgag      960
ctcaagggtga agaagataag gagcgacaac ggggccgagt tcaagaacct tcaagtggag     1020
gagttccttg aggaggaagg gatcaagcac gagttctccg ctccctacac accacagcaa     1080
aatgggtgtgg tagagaggaa gaacatgacg ctaatcgata tggcgagaac gatgcttggg     1140
gaattcaaga cccccgagtg tttctgggtg gaagccgtga acacggcttg ccacgccatc     1200
aacaggggtct accttcaccg cctcctcaag aagacgtcgt atgagcttct aaccggtaac     1260
aaacccaatg tatcttactt tcgtgtatTTT gggagcaaatt gctacattct agtgaagaag     1320
ggtagaaatt ctaagtttgc tcccaaagct gtagaagggt ttttgttagg ttatgactca     1380
aatacaaagg cgtatagagt cttcaacaaa tcatcgggtt tggttgaaat ctctagcgac     1440
gttgatatttg atgagactaa tggctctcca agagagcaag ttgttgattg tgatgatgta     1500
gatgaagaag atgttccaac ggctgctata cgaacctagg cgattggaga agtgcggcca     1560
caggaacaag atgaacgaga tcaaccttct tcctcaacaa cggtgcatcc cccaactcaa     1620

```

gacgatgaac	aggttcatca	acaggaggca	tgtgatcaag	gggagcacia	gatgatcatg	1680
tgatggagga	agaagcgcaa	ccggcacctc	caacccaagt	tcgagcgatg	attcaaagga	1740
atcatcccgt	cgatcaaatt	ctgggtgata	ttagcaaggg	agtaactact	cgatctcgat	1800
tagttaatth	ttgtgagcat	tactcctttg	tctcttctat	tgagcctttc	agggtagaag	1860
aggccttgct	agatccggac	tgggtgttag	ccatgcagga	ggaactcaac	aacttcaagc	1920
gcaatgaagt	ttggacactg	gtgcctcgtc	ccaagcaaaa	tgttgtggga	accaagtggg	1980
tgttccgcaa	caaacaggac	gagcacgggg	tggtgacgag	gaacaaggct	cgacttgtgg	2040
caaaaggtha	tgcccaagtc	gcaggthttg	actttgagga	gacgtttgct	cctgtggcta	2100
ggctagagtc	aattcgcatc	ttgctagcat	atgccgctca	ccactctttc	aggthgtacc	2160
aatggatgt	gaagagcgct	ttcctcaacg	ggccgatcaa	ggaagaggth	tacgtggagc	2220
aacccccctg	cttcgaggat	gaacggtacc	ccgaccacgt	gtgtaagctc	tctaaggcgc	2280
tctatggact	taagcaagcc	ccaagagcat	ggtatgaatg	ccttagagac	tttttacttg	2340
ctaathctth	caaggthggg	aaagccgata	caactctgth	cactaagaca	tgtgatggth	2400
atthgtthgt	gtgccaaatt	tatgtcgacg	acataatatt	tggthctact	aacaaaaagt	2460
cttgtgaaga	gtthtagcagg	gtaatggcgc	agaaattcga	gatgtcaatg	atgggcgagt	2520
tgaactacth	ccttgggthc	caagtgaagc	aactcaagga	tggcaccttc	atctcccaaa	2580
cgaagtacac	gcaagatcta	ctaaagcggg	ttgggatgaa	ggacgccaag	cccgcaaaga	2640
ctccgatggg	gaccgacgga	cacaccgacc	tcaacaaagg	aggtaagtcc	gthgatcaaa	2700
aagcataccg	gtcaatgata	ggtthctthac	thtactthtg	tgctagtaga	ccggatatta	2760
tgcttagcgt	atgcatgtgt	gctagattth	aatccgatcc	taaggagthgt	cacttagthgg	2820
cggthgaagc	aattattaga	tattthgthg	ctacgcctth	cttcgggctc	tggthatccaa	2880
aggggtctac	ctthgacctg	gthggatact	cagattccga	ctatgthgga	tghtaaggthc	2940
ataggaagag	tacatcgggg	acgtgccaat	tcttaggaag	gtccctgthg	tcgtggaact	3000
ctaagaaaca	aacctccgth	gccctatcca	ccgctgaggc	cgagthtgth	gcgcaggac	3060
agththgcgc	gcaactacth	tggatgaggc	aaacctccg	ggactthggc	tacaatctga	3120
gcaaagtccc	actcctatgt	gacaatgaga	gtgctatccg	catggcgga	aatcctgthg	3180
aacacagccg	cacaaagcac	atagacatcc	ggcatcacth	thtgagagac	caccagcaaa	3240
agggagatat	cgaagtgthh	catgthtagca	ccgagaacca	gctagctgat	atcgaagtgt	3300
thcatgthtag	caccgagaac	ctththgcagg	ctgcgtagta	agctaaatgt	cttagattcg	3360
cggaaactthg	attgaattgt	agcatacatg	tgtthtatgcc	thtgatcatg	thcattctgc	3420

attttgttgc ttattgtggt gctcaagttg tacaacact ccctggatct cacaagtcg 3480
 ttgcaaagtg atgctgagag cacctagagg gggggtgaat aggtgatcct gtaaaaactt 3540
 aacttatagc cacaaaaact tgttaaaggt tagcacaata attgccaagt ggctaaagag 3600
 gagatcttgc acaatacgat tatcacagag aattcaacac agaggagaca tagtgattta 3660
 tcccgtggtt cggccaagta caaaacttgc ctacttccac gttgtggcgt cccaacggac 3720
 gagggttgca atcaaccctt ctcaagcggg ccaaagaccc acttgaatac cacggtgttt 3780
 ttgccttgct tatctttatc ccacttacga ggaatctcca cagattggag tctctcgccc 3840
 ttacacttaa gattcacaaa gaagcacgga gtaagggagg gaagcaacac acacaaatcc 3900
 acagcgaaat gcgcacacac acggccaaga atcgagctca aagactatct cacagtttct 3960
 cacaagaaca gagctcgaat cacttagaat cacaaacgga tgcgcaaaga ctgagtgtgg 4020
 atgatcaaga atgctcaaag gttgcttggt gtctccctcc atgcgtctag ggggcccttt 4080
 tatagcccca aggcagctag gagccgttga gaacaaatct ggaaggccat ctttgccttc 4140
 tgtcgtcggg cgcaccggac agtcgggtgc ccgattcctt tccttaattg gcgaagccga 4200
 ccgttgacga tgcgggagcc gttggcgcac cggacatgtc cggtgccacac cggacagtcc 4260
 ggtgccccct tccgaccgtt ggctcggcca cgtgtccgc gcagatcgcg cggtcgaccg 4320
 ttggctcagc cgaccgttgg ctccaccggac agtcgggtgc acaccggaca gtccgggtgca 4380
 caccggacag tccggtgaat tttagccgta cgcgctcagc aaattcccga gagcggcctc 4440
 ttccggccaag gcagcctggc gcaccggaca ctgtccgggtg caccaccgga cagtccgggtg 4500
 cccagaccg aaacagcctc ttggctgtac acagccaagt cttctcttct cttcttcttt 4560
 ctgtttctaa cacttagaca aatatattag tacacaaaac caatgtacta aggcttagaa 4620
 acataccttt gctctagatt ttcactttgt tcatccatgg gcattgattc acatttaagc 4680
 acttgtgttg aactcaatc accaaaatac ttagaaatgg cccaagggca catttccctt 4740
 tcagatgcac agtttgaggg ggagatgtgt tacaacttga ccctttgaga ctaaccgtat 4800
 gcttgagttt gcttgtttta gtctcaaagg agaattaaaa gggaaaaggt ggacttggac 4860
 catgaaagac ttccactgca ctccgatgag agggtagctt attccaagtt catctcatgt 4920
 actcttattg cttttgtatt ctattgaag attttgggtga ggcaatgggg ttcttgggoc 4980
 aagattgatc ctgttttggg gcttgatgcc aaagggggag aaaataaggg ccaaagcaat 5040
 aaatggatca gctaccactt gagaaatttt gaaaacagta gaatagagct tttggtttgt 5100
 caaatctctt ttgttgtctc ttttgtcaaa agttggcctc ttgtggggag aagtgttgat 5160

tatgggaaaa	agggggagtt	tttgaatct	ttcctttgga	atgactctcc	ttatgcttca	5220
acatgtgtgt	ttgacttaga	gatagagatt	tgagtttgat	ttgcaaaaac	aaaccaagt	5280
gtggcaaagg	atgatccata	tatgccaaat	tgaatcaaaa	taaatttgag	tttttatttg	5340
aagtaatatt	gcacttgttc	tagttgcttt	atgtagtggt	ggcataaatc	accaaaaagg	5400
gggagattga	aagggaaatg	tgcccttgga	ccatttctaa	gtattttggt	gattgagtgc	5460
caacacaagt	gcttaaagt	gaattcatgt	ttatggatga	ataaagtga	aatcaagagc	5520
aaaggtagtg	ttctaagtct	tagtacattg	gttttggtga	ctaataact	tgtctaagta	5580
ttggaaacag	gaagaaaaag	aaaagaaaag	agttggctgt	gtacagccaa	gaggctgttt	5640
cgggtctggg	caccggactg	tccggtggtg	caccggacag	tgtccggtgg	tgcaccggac	5700
agtgtccggt	gcgccaggct	gcctcggccg	aagtagccgc	tctcgggaat	tcgctgacgg	5760
cgtacgacta	taattcaccg	gactgtccgg	tgtgcaccgg	actgtccggt	gtgcaccgga	5820
ctgtccggtg	agccaacggt	cggccggggc	aacggtcggc	cgcgcgatct	gcgctgaca	5880
cgtggccgag	ccaacggcta	gaagggggca	cggactgtc	cgggtgtcac	cggacatgtc	5940
cgggtgcgcca	acggctctct	ggcgggcaac	ggcgggctgc	gccattttag	gaaggaaatc	6000
gggcaccgga	cagtgtccgg	tgtgcaccgg	actgtccggt	gcgcccgcg	acagaaggca	6060
aggatggcct	tccagatttg	ttctcaacgg	ctcctagctg	tcttggggct	ataaaaggga	6120
cccctaggcg	catggaggag	tacaccaagc	attcctacaa	cattcctaag	caccaagaca	6180
tcgatctcac	gcattcggtt	cattgtgata	gcattctagag	ctcttggtga	gttgcgaaact	6240
ctttgagttg	tgttgcgagc	tcttggttgc	acttggtgtg	gtgttggtgc	tctgatcttt	6300
tgaagtcttg	tgtgcgttgc	tcattccccc	tttgctctgt	gttctttgtg	aacttcaatt	6360
gtaagggcga	gaggctccaa	gttggtggaga	ttcctcgcaa	acgggattga	gaaaaaaagc	6420
aagcaaaaca	ccgtggtatt	caagtgggtc	tttggaaccg	ttgagagggg	ttgattgcaa	6480
ccctcgtccg	ttgggacgcc	acaacatgga	gtaggcaagc	gttggtcttg	gccgaaccac	6540
gggataaacc	actgtgtcgt	ctctgtgatt	gatctcttgt	ggtattgtgt	tttggtgaga	6600
ctcctttcta	gccacttggc	atttattgtg	ctaacactta	acaagttttt	gtggctataa	6660
gtttaagtgt	tacaggatca	cctattcacc	ccccccccct	ctaggtgttc	tcacctatgc	6720
accgtagct	aggcttgagt	caattcgcgt	attattggcc	tatgctactt	accatggctt	6780
taagctttat	caaatggacg	tgaagagtg	cttctcaac	ggaccaatca	aggaagaggt	6840
ctatgttgag	caacctcccg	gctttgaaga	cagtgagtat	cctaaccatg	tttataggct	6900
ctctaaggcg	ctttatgggc	tcaagcaagc	ccaagagca	tggtatgaat	gccttagaga	6960

tttccttatc gctaattggct tcaaagtcgg caaggccgat cctactctat ccactaaaac	7020
tcttgacaat gatttgtttg tatgccaaat ttatgttgat gatatcatat ttgggtctac	7080
taacgaatct acttgtgagg aatttagtag gatcatgaca cagaaattcg agatgtctat	7140
gatgggggag ttgaaatatt tcttaggatt tcaagtgaag caactccaag agggcacctt	7200
cattagccaa acgaagtaca ctcaagacat tctaaacaag tttggaatga aggatgccaa	7260
gcccatacaa acacccatgg gaacaaatgg gcatctcggc ctcgacacgg gaggtaagtc	7320
cgtggatcaa aaggtatacc ggtcgatgat tggttcattg ctttatttat gtgcatctcg	7380
accggacatt atgctttccg tatgcatgtg tgcaagattc caatccgacc ctaaggaatc	7440
ccaccttacg gccgtaaaac gaatcttgag atatttggct tatactccta agtttgggct	7500
ttggtaccct cggggatcca cttttgattt aattggttat tccgatgctg attgggcggg	7560
gtgtaagatt aataggaaga gcacatcggg gacttgccag ttcttgggaa gatccttgg	7620
gtcttgggct tcaaagaagc aaaattcggg tgctctttcc accgccgaag ccgagtacat	7680
tgccgcaggt cattgttgcg cgcaattgct ttggatgagg caaacctgc gggactatgg	7740
ttacaaatta accaaagtcc ctttgctatg tgataatgag agtgcaatca aaatggccga	7800
caatcccgtc gagcatagcc gcactaagca catagccatt cggtatcatt ttcttaggga	7860
tcaccaacaa aaggagata tcgagatttc ttatattaac actaaagatc aattagccga	7920
tatctttacc aagcctcttg atgaacaaac ttttaccaaa cttaggcatg agctcaatat	7980
tcttgattcg cgcaattttt ttgctagat tgcacacgta gctcatttat ataccttga	8040
tcatatctct ttcatatgct atgactaatg tgtttttcaa gtccatttca caccaagtca	8100
taggtatatt gaaagggaat tggagttttc ggcgaagaca aaggcttcca ctccgtaact	8160
catcctttgc catcgctcca agaaaaggac cttgtctttg ggggagagag taaaagccca	8220
aagcaaaagg actggacttc gtcttttgga taatcttaac tcatttactt atgaccaaag	8280
gggaagatag tacttctatg ggctctaag attccgtttt tggcgattca tgccaaagg	8340
ggagaaagta tgagcccaaa gcaaaaggac cgcaccacca ccaatttcaa aaacttagtg	8400
ctttctaaga gtatttatca attggtatcc tattgtgttc aaaaggagga gaaaattagt	8460
ttttcaaaa atgtatatca aaaccctctt gaactaag aggtggatct cctttagggg	8520
gaattttttg ttaagtcaaa ggaaaagcat ttgaaacagg gggagaaaat ttcaaatctt	8580
gaaaatgctt tgcaaaactct tattcattta cctttgacta tttgcaaaag atcttttgaa	8640
atggatttac aaaaagaatt tgcaaaaaca aaacatgtgg tgcaaactg gtccaaaatg	8700

ttaaataaga	aagaaacaat	ccatgcatat	cttghtaagta	gttatattgg	ctcaattcca	8760
agcaaccttt	acacttacat	tatgcaaact	agttcaatta	tgcacttcta	tatttgcttt	8820
ggtttgtgtt	ggcatcaatc	acaaaaaagg	gggagattga	aagggaatta	ggcttacacc	8880
tagttcctaa	ataatthttg	tggttgaatt	gaccaacaca	aataattgga	ctaactagtt	8940
tgcccaagt	tatagattat	acaggtgtaa	aaggttcaca	ctcagccaat	aaaaagacca	9000
agttttggat	tcaacaaagg	agcaaagggg	caaccgaagg	caccttggt	ctggcgacc	9060
ggactgtccg	gtgtgccacc	ggacatgtcc	ggtgcaccag	ggggactcag	actcaaactc	9120
gccaccttcg	ggaatttcca	gaggcgactc	ggctataatt	caccggactg	tccggtgtac	9180
accggacatg	tccggtgctc	caaggaaggt	cgccctcagg	aactcgccag	cctcggtttt	9240
tctccctcgc	cgctccgcta	taattcaccg	gactgtccgg	tgtgcaccgg	actgtccggt	9300
gcaacctcgg	agcaacgggt	acttcgcgcc	aacggctacc	tgcaacggca	tttaatgcgc	9360
gcgagcagc	cgagaggatc	agaatcgccc	atgctggcac	accggacagc	aaacagtaca	9420
tgtccggtgt	gcaccggaca	cccaggtggg	cccacaagtc	agaagctcca	acggtcagaa	9480
tccaacggca	gtgatgacgt	ggcagggggc	accggactgt	ccggtgtgca	ccggactgtc	9540
cgggtgcgca	tcgaacagac	agcctcccaa	cggccacttt	tggtgggttg	ggctataaat	9600
accccaacca	ccccaccatt	cattgcatcc	aagttttcca	cttctcaacc	acttacaaga	9660
gctaggcatt	caattctaga	cacacccaaa	gtgatcaaat	cctctccaat	tcaacacaaa	9720
gccctagtga	ctagttagag	tgatttgccg	tgttcatttg	agctcttgcg	cttggattgc	9780
tttctctctt	tcattctttc	ttgtgttcaa	tactcacttg	taaccaaggc	aagagacacc	9840
aattgtgtgg	tggtccttgc	ggggaggttt	ttctcccggg	tgatttgaga	agagaaaagct	9900
cactcggctg	gagggaccgt	ttgagagagg	gaaaggggtg	aaaaagacct	ggcctttgtg	9960
gcctcctcaa	cggggagtag	gtttgagaga	accgaacctc	ggtaaaacaa	atcctcgtgt	10020
ctcacttcat	tatttgcttg	cgatttggtt	tcacgccttc	tctcggactc	gattatattt	10080
ctaacgctaa	ccgggcttgt	agttgtgttt	atatttgtaa	atttcagttt	cgccctattc	10140
accccccccc	ctctaggoga	ctatcaccag	gcggtagtcc	gcgagccaca	gttccggtct	10200
cgtttccccc	gaatacttcg	tgatagtagt	cgggggtcgg	aaccgggtcg	ggaacgacgc	10260
ccgtcggatg	gcccgactga	aggcttgccg	accgggtggg	tcgggcgagg	gactccgatc	10320
cctccccact	gtcgtagcgc	ccccccacgc	ctgggggtgg	agcctcggcg	caccctttcg	10380
tcgaggtggg	cccgcaggtc	gcgtcgatgg	tgctcgttgc	cgaggtggcc	cggggccgca	10440
ggcgcggtgt	tgcgctgctg	tccggtatag	accgaggctt	ccgcataaaa	ttgggaagtc	10500

gcggcgtag gttccgaggg gtatccccgc ctccgggagg cagtgtcttc ggcccgtcgg 10560
 gccgcagcgc cttccaggag attcttgagc tctccctgga ttccgccgacc ctccgttggtt 10620
 gatggctccg gcatcgtgcg gaggagcatc gctgcggctg ccaggttctg accaaccctg 10680
 ctggatgcgg gcggcgccct gagcctgaca tcgttggcga cgcggtgctg gagaccttg 10740
 ggcaggtgac gtattttctcc ggccgagggg tggcccgccc atacctgccc gacgtcccgg 10800
 cggatcgtct caagcgcccc tgttccctcg tcgagcctgg cctgcgcccc gcggacttgc 10860
 tcgagctgtg ggtcgtgacc ccccgccgga acggggacca cagctagctc ccgcgggatg 10920
 tcggcgcgag ggcaccggcc taggaaaatc accgtcctcc ggcatgcaa gatggttgcc 10980
 ttcggaggga tcccctagct cgacgtggaa acattcgcgg cttgggccgc agtcctcgtc 11040
 gtcaaggctg cggcttccgt cggaacagtc ggagaggcag tagtcacatg cggtcatgaa 11100
 gtcccgcatg gactgggggt tgccaagtcc agagaaaccc caacagatgc tgggatcgtc 11160
 atcttcctcg gaccagagg gcccgtaggt cgagacgtcc gtcaatcggc cccaaggcga 11220
 ccgcatacga aaccccagtg gggttgcact cgcctcaatg agagcgcccg ccaaagcgag 11280
 gtcgcttggc gggtcgaggc cgagtcgaaa tgacgtaaga tgggagttag ttagtacctt 11340
 ttggtcgacg cggagcgacg tagtcacatc ggggactggg tgcaccgtca tctcaggtac 11400
 gagggcgacg tcctgcaggc tttccgcgag cgtgctggcg tcttcttctt gctcgggatc 11460
 agcgtgtcgc ggggggacgg cgcttgccct cgtctcgaac gcgaggtcga cggccggcgt 11520
 gccctccgtg ggggcgctgg ggacgtcgat tcgctcgaca gccgacgaag cgcggcctcc 11580
 cacttggcct tggttgcccc gcctcctcct ccgttggcgg gggagaggac ggggcgagct 11640
 cgaatgttgt ttttccaccg cgcggggaag atgtcgtcgg ttccgccgcc gacgggcggg 11700
 atgtcggccg ccattgtcgt tgtcgcgcgg cgggtggaag agtatcatgt cgtagctgcc 11760
 gtcgaaggac atgaactcaa gactcccgaa acggagcacc gtcccgggcc ggagaggttg 11820
 ctggagactg cccatctgga gcttgacggg aagctgttcg tcagcacgca gcaggcccct 11880
 acctggcgca ccaactgtcg gcgtttcgag accggggggg ccccgagccg acgagtgagt 11940
 gtgccgcgtg cccagccca gatgggtcga gcgcgtgggc gagcggaag gggggagagg 12000
 cgaggtgtcc ggagacgggc gtgagagagg tggagatccc gcggccttcg tgttcgtccc 12060
 gcgcccaggt cgggtgcgct tgcagtaggg gggttacaag cgtccacgcg ggtgagggaa 12120
 gcgagcggcc ccaagagagc gcctgtctcg tcctcgtccc cgcgcggcca accttcteta 12180
 agaaggccct ggtccttccct tttataggcg taaggagagg atccaggtgt acaatggggg 12240

tgtagcagag tgctacgtgt ctagcggagg gagagctagc gccctaagta catgccaatg 12300
 tggcagccgg agagatcttg gcaccctact ggcgtgatgt cgtggctgtc ggaggagcaa 12360
 cggagcctgg cggagggaca gctgtcggag cggtcgagtc cttgctgacg tccccttgct 12420
 tccgtaagag agctgagagc cgccgtcgtc acagagcttg tggggcgcca tcattgcccc 12480
 tctggtggag ctagccagag gggacaccgg tcttgttctt cgtgaccgga gtcggctcgg 12540
 ggtaggatga tgatggcgct tcccgttgac gtggcgggcc tgtgccctag gtcgggcgac 12600
 gtgggggctc ctccgaagcc gaggtcgaat ctgtcttccg tggccgaggc cgagcccgag 12660
 cccctgggtc gggcgaggcg gaggtcgttc ggtagaggcc agggcggagt ccgagccctg 12720
 gggtcgggcg aagcggagtt tgctgtcttc cgggtctcag cccgagtcg agctttgggg 12780
 tcgggtggag cggagtctgt cgtcttccgg gtcttagccc gagtccgagc cctggggctg 12840
 ggcggagcgg agttcgccgt ctccgggtc ttagcccgag tccgagccct ggggtcgggc 12900
 ggagcggagt tcgtcgtctt ccgaggctga gcccgagtcc gagccctggg tcgggcggag 12960
 cggagcttcc tatggcgctt ttggcaaggc ctgactgcct gtcagactca ctttgtcgag 13020
 tggcactgca gtcggagtgg cgcaggcggc gctgtccttc tgtcagaccg gtcagtgggtg 13080
 cggcggagtg acggcgggtca cttcggctct gccggggggc gcgcgtcagg ataaatgtgt 13140
 caggccacct ttgcgttaaa tgctcctgca actcgggtcag tcggtgcggc gatttagtca 13200
 gggttgcttc ttagcgaagc caaggcctcg ggcgagccgg agatgcgtcc gccgttaaaa 13260
 gggggggctc gggcgagaca gaagtcctc gaggtcggct gcccttggcc gaggtaggc 13320
 tcgggcgaag cgtgatcgag tcaactcgtat ggactgatcc ctgacttaat cgcacccatc 13380
 aggcctctgc agctttatgc tgatgggggt taccagctga gaattaggcg tottgaggg 13440
 acccctaatt atgggtcccc acaactataa aocccaaagg gttgttttag aagtctaggt 13500
 agcttttttg tctattagag agagagtata ttagaaatth attttagtgt gtgatttctc 13560
 gcaattgaga tatgttttta aagtagataa taataataaa ataaacatct atgatggagt 13620
 tttgttggtc atttggattt tgaatctcaa cttcaaaact gtattagaat ttgaaacttg 13680
 aaaataaaaa ctgaaataaa aagataagga aaaaacaaaa ccaactgtcg gccactatct 13740
 cccctagtcc tagccatgcc cctcttcca tcagtcgagt gggtcagttg gccggcccaa 13800
 caccgcacca gcatgatagc atctcgcacc cgctgggttg gtttcacagg cgaccatgcg 13860
 ggaccacagt tcagcctctc cgcgctcgtg cctatggacg gtagtcggca gacaccaatc 13920
 aatggggctc gcgcgaccgc gtttcagttt ctgctcgtcg tacgcatggg tcaactgttag 13980
 caccacggaa cacagaagac agcaagggaa agaggaaggg caacttggag cagaagaaga 14040

agaatagggg acgcaacgtg gcggatgttc tttgttattt cgttcatatc ctcagcagcc 14100
 tagcacatag tctatatatg tcaactcctga actggactgc cacaatacgg cttacacggg 14160
 ccactgcggc ccaaccacat ttaagtttgg cttcctggtc ctcagcagc gaggctgcat 14220
 catctcctga tgtgttgccg ctgtctccag gtcttgattc ccacttgctg ccagcttctt 14280
 cttgtcttcc gaagacgctt tgctgacatt cccctgtcct cgagcgccag cttgggtcca 14340
 gatcaacgct tttggaaacc gagcacgcag tgcctcaacg tcctcccagg tagccagatc 14400
 ctcagtcatg cctgaccaga ccaccttgac ctgcgcgatt aactcaccac cacgggtcaat 14460
 gaagcggcat tgtagaatac atgtaggcac ctggataggg ccaacatctt ggggcagctg 14520
 aggtgaggcc cgttgatcac gcccgatgac ccgtttgagc tgtgacacat gaaaaattgg 14580
 gtgaatagag ctggaggccg gtaaagctag acggtaagcc acggaaccca gacgatcgta 14640
 atctggaaag gaccaaagaa tttgaaggac aacttgatgat tggagcgtgt agcaaccgaa 14700
 gattggatat aaggttgtaa cttcaagtaa acccaatcac ccaccaaaaa cacgcgttca 14760
 ctgcgctgct tgtcagcttg ccgtttcata cggctcttgag ctcgatgcag atgcaattta 14820
 atgactttgg tcataagctc tcgttccttc aaccaagttt cgagctctgg ctgtggcacc 14880
 acaatatcaa ccaaaattcc aaaatatcgc ggagtgtggc catataacac ttcaaagggt 14940
 gtacgccccca aggttgaatg tactgtggta ttgtaccagt attcagcaac tgacagccaa 15000
 gctgaccaac gtgaaggaca agtgtgcaca tagcaacgaa gaaaagtttc caagcattga 15060
 ttcaagcgtc ctgtttgtcc atcggattgg ggatggtaag aagaggacat ggacagattg 15120
 gtaccctgta tctgaaatag ttgttgccag aatgagctag taaaaattct gtcgcgatct 15180
 gaaatgatgt tgacaggtaa cccgtgtagc ttgtacacat tgtcaagaaa aacacgagcc 15240
 acttttagcag ctgtgaaggg atggagtaaa ggtaagaagt gtccatactt cgaaaattta 15300
 tccacaacca ccaagatgca gttatagtga gctgaacggg gcaaaccctc aataaaatcc 15360
 aatgaaactg tatgccacgc ttgtggtgga acttccaaag gctgcaatag gccaggatat 15420
 ttagcacgat cgggcttgga ttgctggcat accgtacaag attgaacgta ctgtagcaca 15480
 tcagcacaca tacctggcca atagaacatt tgtttcactt tgtgatatgt tgctggggct 15540
 ccagaatgac ctccgaccgc cgtatcatgc atagcttgta ataccttctg ttgcagctgc 15600
 aaattgccgc ccaccagat tctatTTTTTg tgtcgaatga ttccttgatg caaggaaaaa 15660
 ggagctttgt ctgcagaatt caaaattaat tgagccagca actgtttact agtaggatcc 15720
 ttgtcatagc cttccactcc ctctgcagc caagtaggca cactgtgaga aatagcacia 15780

cagtgactat cttcctggac ttttcgagac agtgcactctg cagctccatt atccaccct 15840
 tttctgtaga caatcttata ttgcaagcca gccaatctcg tatacatttt ctgttgccag 15900
 atagtatgta aacgctgctc attcagttgt gctaaactcc tgtgatctgt atagataatg 15960
 aactcagcca actgaagata ggacctccat tgagcaatgg ctaaaataat ggccatgtat 16020
 tccttttcat aggtcgagag tccttgattt ttcgggtccaa gagccttgct cagaaacgct 16080
 aaaggatgtc cactttgcat aagcaccgca cccacaccat aataggaagc ataagtatga 16140
 atataaaatg gctgggaaaa tcaggcagag ctaacactgg tgcagtgacc aatgcttggt 16200
 tcaaaacttc aaaagcttta aaatgatcca ctgtccacac aaataaagtg tgtttcttca 16260
 agagatcaaa taaaggtcta ctgataattc caaagtgtt gacaaatttt ctgtaaaaac 16320
 cggctagacc caggaaacat cgcagttcct tagcattggt tggtagtacc caagaggata 16380
 tggcttgaat tttagtagga tctgtggata ccccttgctc actgatgata tggcccaagt 16440
 aagcaatatt tgtttgagca aattcacact tagataattt gactttccaa ttatcagaca 16500
 acaataattg caaaaccttc tgcagatgca gtagatgctc ttcaaagac ttactgtaaa 16560
 ccaagatgtc atcaaaaaaa ccagagcaca ttttctcaat actggtttca gggtttcatt 16620
 cgttgcaatt aagaatgtgt taggagcacc tgtcaagtca aaagccatca ctctaaactc 16680
 atagtggccc acatgagttt gaaatgctgt tttatattct tcgccagatt tcaaaagaat 16740
 ttggtgatat ccagctctga gatccagttt actaaaccat ttagagtggg cgagctcatc 16800
 aatcaattgg tcaaacacag gaactgggta tttgtctttg agagtggagg cattcaaata 16860
 cctatagtcc acacaaaatc gccatgtcat gtcttttttc ttgaccaaca ccatagggga 16920
 agcaaaagaa ctattgcttt tctgaataac accttgatga aacatctctt gaacttgttt 16980
 ttcaatttca tccttcaggg ctggaggata cctgtaagggt ctgacagaca ctggctgagc 17040
 acctccacc aaaggaatag catggtcaca atccctgctt gggggcaaac cctgaggttc 17100
 gtcaaagact gagctgaact gttgtagcaa tgcttgaatt gcaggatggc tgtcaggaga 17160
 agagcctacg gaactgacag attccatgaa caacaactct atcatagtat cagcaggtag 17220
 ccctggggtg ttgccctgca gcagcacaga agagccttga tatggtataa ttagccactt 17280
 ttgagcccaa tccactctca tgggactaaa ggatttaagc caatccatgc ctaccaccat 17340
 gtctgtagtag ggaaggggca ggaatgaaac gtccgaagta aaactgcagt tctgaatctg 17400
 ccattgtgcc tgcaacaatt tgtaatgaca agtcaccata gcccattgg ccacttgac 17460
 ttgcagagta gatgcatag atgtcaccct ttgcaagtgt ggtctaagtt gatcattcaa 17520
 aaagggtgtg gagctgccac tatctatcag aataagtaag ggatgattct gaatgctccc 17580

atttaatttc agagtttgtc gaccagtcga ccccgctccat gcagatttgg aaatagtcac 17640
 gaacaactgt tctagagcag gttcaggtgg agataagtca gattcgggta cttcttcac 17700
 caccaataat gaccaaact cctccatagc atgaagttga gcagtggcaa cacatttgtg 17760
 accgggattc cacttttctg cacacttgtc acaaagacc tttgctcgac gaaaacgtcg 17820
 caacgattcc agcttatcag aatgagatgc agattgagtt gaatccttgt ttgaagtcca 17880
 tttagttgaa gcagacaact gcacaccagt cttggggcca gcatgacttg aatatggttc 17940
 agaacggcgc caacgtctcg ccgttgtggc ctctcctgc accaacgcga gagaacaggc 18000
 agtgtccaaa ttcgacgggc gttgcacat aataacagct ttaatatcat cacgcaaacc 18060
 atctatgaac cgcattgtgt aatacaatgg gtcagcattt gcttcatatg cagacaagtg 18120
 atcaacaagt attgaaaatt gttctacata ctgagctacg ataccggact gatgtatgtg 18180
 gaaaagttga cgaattaagg attcatgctg ctctctacca aatctatcat gaagctggcg 18240
 aaaaaattca gaccacgaca acatacgcac cctctgacca acagactgta accatgatgc 18300
 agcacgcca ataaaatgca tagtagctac acgaatccac atatatggtt ccacgtcata 18360
 catatcaaag taattttcac aaagcgtctt ccacaactga ggattgtccc cgtcaaagtg 18420
 agggaaatta accctcggtg ggttaccgtg cccacagcga aaccctcgt gaccgccatt 18480
 cagttcagtg tgacgaacag aatcatcaaa tggatcaata cgaggtgaat cgtggtacgt 18540
 acccttgacc gggacatggg tttgagcatg accatgccca aaccacgcg cccggtgaca 18600
 tggttcagcg tgggtggcaa atggcccgtc agcgggttgt ttcccggcag atggatgctc 18660
 ggacgccaac ccggaaggag tgaagagacc tggcttggtc tgatcagcgg cgatcgtctc 18720
 acgtccatg aacttgggtg cacgcttgc ctgaggaag aggttctcca gacgcctctc 18780
 cacttctggg cgccaagtat ccacctcgga atgccccatc ttgagtgaga tgaagcgtgc 18840
 ctccgcttgt tgcgccatcg cgtcgatccg ttgctcaatc gcgccgcagc gattctccag 18900
 cgtcgcagcc atgcgtctt ccatctgcga caaggcctct agaaccttct gcatcgcgga 18960
 atccataccg gcgaccgag tggatcgagg gcgccgaccg ggtatgggat ccagattctc 19020
 taggatgaac tagtctgata ccacctgtta gcaccacgga acacagaaga cagtaaggga 19080
 aggaggaagg gcaacttggg gcagaagaag aagaataggg tacgcaacgt ggcggctgtt 19140
 ctttgttatt tcgttcatat cctcagcagc ctgacacata gtctatatat gtcactcctg 19200
 aactggactg ccacaatacg gcttacacgg cccactgcgg cccaaccaca ttttaagttg 19260
 gcttcctggt cctcagcacg cgaggttgca tcgtctcctg atgtgttgct gctatctcca 19320

ggtcttgatt ccacttgct gccagcttct tcttgtcttc cgacgacgct ctgctgacag 19380
 tcaccgcccg acagacttgt gggcccgtt cgccagaacc ttctgtctccc tcccgtaacg 19440
 aactagggca caacacaaac ttgtacttgt gtagccgggg tgtgtttact ggccgaccgc 19500
 acccgcttg gactcgtcca ctgcccctat ataaacggtc gcccccgcc ctcgatcaat 19560
 cagagttag gagcccctgc tacctgttgt cgtgtggcgc cgtcgcaatg agctcgacgc 19620
 cgcacgccat cgtaattcag ccacacctac gcttttgcct tgctttcggg aggaggtttg 19680
 agggtttcgc cgtcgtacgt gggagctgct ggatgtttcg ttaggtgagg gaatctactg 19740
 gaggcaggca ctgctgcccg aggatcaccg ttgcatccca agccaccgtt cgacgtcgcc 19800
 gactctcgcc ctcaatttag ttaccgacga ggacccttg actgtttcgt ttgcttctca 19860
 ctctgacctg ggcacgagta gcgctttaga tcgggttttg ggcactcgga ttgctcgccg 19920
 gtgttcagag attaccacag agtcacgctg tgctgagcgc gaggctcgac gctgcatgat 19980
 cattgatcag accttgtccg tgttgtcttc attgaccaca gcttcgcata ccaccatttg 20040
 gattggagaa atagagcgca aggtcgtcgg ttcgctgtg ctacgagct gtcagggcgg 20100
 agctctatct ctgccaccat gacgcgttg tagagaaagg agcggcatca gttgatcagg 20160
 attaaatccc gcgtaccct tcagcacatt aaatcaaagc cgtcagatct aatctagacg 20220
 tttgtgattc gataatagcg tgtcggttta gtatttaaatt ctggaccgtt gatctctaga 20280
 tgatcgcctt aggtcgtgta ccagttagt tagttgggtg aactttatta aagagcccct 20340
 ataaaattta ggaattaacc tgcaatcacg tgatatttag aaagtcattg agctaggtca 20400
 tgttcttaac atattagacc cgatggattt tagaatcgga agtacacatt aaaggtatga 20460
 ttctatactt agtacattag tttttgtgta ctaacacatt tgtctaagt ctagaatgag 20520
 aaaaaagaca aaaggaaaa gagttggctg tgtacagcca actgctgttc agtctgggtg 20580
 caccggactg tccggtgagc ctacagtcgg ccgcgcaatc tgcgctgac gcgtggccgg 20640
 gccaacggtc tgatgggggc accggagtgt ccggtgtgca ccagacagt tccggtgcgc 20700
 caacggctcc aaatcttcaa cggtcggctg cgccaaaata ggaaagcaat cagcaccggg 20760
 cagtgtccgg tgggtgcaccg gactgtccgg tgcaccacc gacagaaggc aaggataacc 20820
 ttcttgatt gctctcaatg gctcctagct gccttggggc tataaaaggg acccctaggc 20880
 gcatagagga gtacaccaag catactataa gcattcttga tcattcacac tccgtctctg 20940
 ctactcgat tgactttctt agtgatttga gctccgttct tgtggcgaat cttgtgctat 21000
 tcatttgagc tcaagtcttg gctgtgtgtg cgtattgctg tggatttgtg tgtgttgctt 21060
 ccctccccta ctctagtgt ttactttga tccttattgt aagagcgaga gactccaagt 21120

tgtggagtaa atgaaactga accctaaacc ctaaaccctc taaaaatgac taaaaatgcaa 21180
 aatagacggc gcatacataa ctaggagtaa aatgtccgaa aaaaaatcgg ctcgagtctc 21240
 gagactcgag tgccctctct gcctataaat cgaaccctaa ccctttttcg tacctgtttg 21300
 tgtccttagg gtttaggggt ctctgtcat tcgttcgcca cctcgcccca agacgtctcg 21360
 ctagggtttc gccacagccg ccgccatgcc tcgccgcaag cttaggtaac cttctcctct 21420
 ggcgccctct aggggtttgt ttcgagattc ggttgttcct tgcgttgacg ggccggggct 21480
 ggctcctcct ggatctgggg ctcaggcgcg taggcttggg cgttagtaga tttgattcag 21540
 tcggtatgat gtcgttaatc gtttgtttta gtatgtgcaa atgatactgg ggttgtgggg 21600
 ataggattgc gcatgtttgc catgtttagt tgcagaaata tccggatctg tttcttgctg 21660
 tcaatgggct ggtctcttct ctgttttagat aattgtaaga aatggacggg tgttcataat 21720
 cgacagagat ccgattgctt ctcgaataac cgattgcaga tactatctgt tcgcaggcgg 21780
 ttcagacagg ggcataagaac aaatctgaat cccacgagg gaaggtttat ttccattaat 21840
 cctttctcgt taggattcgt atagatttac atatatacta caggttgtct tatgaggtgt 21900
 ttggtatatt cttgaaagtt aattcaccag ggtagtggac tgaatcttat gaatgttgta 21960
 tgtgtgtagc tgtattgtat tgtccgttta taatgcctct ttgagtagcc attacagtcc 22020
 ctgagtactg tottggttta gttagggggc gcaaagcact ggacatctga tgtccactca 22080
 ggccctttga gggggtagct cactgtctt accaagaagt gcccccaag cagccttaga 22140
 catacatcta cataatctct gtttgaagt gcctctttga gtagccatta cagtccttgg 22200
 gtactgtctt ggtttagtta gggggcacia agcaatgggc atctgatgtc cactcacctt 22260
 ttgaggggca ccttatctgt cttacaaaga agtgccctc aagcagccct agacatatat 22320
 ctacattatc actgtttgat ctgtcctcaa tgccacgtct tttcacttag ttttggcac 22380
 tcatatttgc tttattgagt tgccactgta gttgtatata caatcttggg ttagttagga 22440
 ggcacatgtg atcttgaaaa aaactgacat ttagtggtta tcatcttcc tgttgatgg 22500
 tagacatgta atgcaaaaca ttcaaaagat tgcttggtgta cttgattagt atcaaggttt 22560
 cagggagcga tgacatttct taatatattt ggaggactca acttagttac taactggact 22620
 acaagtaaca aataatgtgc ctcttgtctt tattcatccc ttcttagatt gattcctaca 22680
 gttactgtct attttcatca tttttgctgg tggaagatgt ggttgagctt gctttacagt 22740
 attttggttt tgttagcttg tgttgcatct ctctctctac atttattatg tgttgatttt 22800
 tgagttaaaa ctttgtttat gataaaccat gttgctttct ttggttaatt tttttgctt 22860

aatgcttatt cccccactgt actgtcagga aggtccgcgg ctacgccccg gctccacatg 22920
ctgctccagt gaggaacca ccacagcctg gtaaagtgat tcacgcagac aataagtatc 22980
tttagaactg acattggcat ggtaatcatg cctcttttga ctctgcagta ttctattgtg 23040
gacatgtgtt tcaattatgt aacttttagtt atatttttgt ataactgttt gctcagttgt 23100
tgagaatgtg ttcggtttgt tactataaca atgttgatga cataaatata ctgttaagtt 23160
tatattggaa tttgtggtac aagtctgaag ttgttgattg tgtttgaagc agagtcaatg 23220
gcatttcggt ttatatagag aattacagtt ccttgttttt tggtagaact ggaacctgtt 23280
tcagttctgt tcctaattgct tacacatggg tttgtgctac aagtatagta ttagtattac 23340
agagctcatt gttttggaat cttgattgct ttggaatcag aatcgtttat gtttagctca 23400
tattagtatt agtattacag ctcatgtgtt ttatatagga gttttaatct gttctatttc 23460
tgttcctaag tgtcttctga cttttctttt tggcagcgcg ctaggctcgt cctccagctc 23520
ctgttcgtga tgggtggtgt ggctccattc ttggaggaat tgggtccacc attgcttaag 23580
gtagttttca aagcttggtc ttttttgaat aacttcagca acaaacatta tcataatcct 23640
tgaattgatt tgaacgaaca cattgtttta ggtatgccat ttggtacgag tagtgccatg 23700
gcacacaggg ctggtgatgc tgtaatgggt ctccggactg ttcggcatga gattgttatc 23760
tcagaagctg ctgctgctgc ccctcctgct ccagtgatga acgctaattg ttgcagcatc 23820
cattctaagg ctttccaaga tgtatgtctg cttgccacct ttatgctgcc ttgttttccc 23880
tcaatttgat gcatgaaaca tttggttact cacttctgtg atgtagtagt gaagttttat 23940
gggtgtctttt tttttccttt actgaacctg caaattactt aatcatcaaa ccttggccat 24000
caatcaagtt ttaatattat gggcatgac ctaccgttg ctttgttgag gtcattgtta 24060
gaattgttaa cctgcatttt gtatactcat tcgatgatgt gttctcaccg attttcttgg 24120
ttgatgcagt gtcttaacaa ctatggcagt gagatcagca agtgccagtt ctaccttgac 24180
atgttgaacg agtgccgccg tgggtgtgtc tgctgagct tttgctcaa ttgggattat 24240
tcatggattc tcttttctc cccatgtatc tcattaataa gacaccgtga aacttttaac 24300
cctctccacg aatgcacat ggcatcacgg gttcatcttg ttgaatctgt ggttacgttc 24360
tctttatcct gtgttggttg aacagacttc tgtctcttct ggtgatcata aatatttaaa 24420
tgaaccagtt gtgttgga aaatgtgttt cttttgtctc tagactggaa agcggagttc 24480
tcgtcaacac ggttctttca actagggatg aaagtggtaa tccgaattgt tagtacaat 24540
ttaatatattt aaaatagata tgtataaaat tttatgttga tcttttttat gttatcaagc 24600
acattagtat aaattagtat aaatatgaat aaaatattac ataaaatgtt ttatgtatta 24660

tttggtcctt acaacataaa tagttgaaaa aattactaaa tttgttttcg aatctatatc 24720
 gaagttttata tctattatct aagaaaaata taggatgaaa aggtttatct tttatgaatc 24780
 tttacaagct ggatcttata aacaagaaaa taaatttata ttgtagattt tatatcctat 24840
 ttatttcgcaa tcaaagaaaa gcgactaaaa aactgattac cgagtaaata ctgtttccaa 24900
 ccgttttcgt cctactatc aacgccttct cccaaccgca gtcgatctgt ccgtctgtat 24960
 caggcgcagc ggcacccctg ctgttcgact atctagacca tagaatatct taggtataca 25020
 ataatttttag ttccacgcta gaacatttta gttagaataa taacaagatt tgctattgat 25080
 gtaggactcg ccggtcactg tctaaaaaag cattctgtcg gtcttattct ttaggcattc 25140
 gcgggtgtac tatctcattt ttctatcat attcctcagt actctgttaa gtataaatgg 25200
 tctattttac atgatgaact aataaaacta attaaggatc ctaacttttt gtgaaggtaa 25260
 tttggatcat tatgcattac catcctacgt atacctgctg cagcagcatc tgcgtaagca 25320
 cagcctagat atatgcttct gtgtggactg aaaggagact ttgtttatca attagtatac 25380
 tccccaaaaa ctgatgacac caatgatgca aataggctgg gaatagtctg tctaataggt 25440
 tgagtgaatc atgtcactgt gcgtcctctg caggcagttg ttgacatgag cgcacgtca 25500
 ctgctgaatc gccatggtct gaaggcaaca gataaggcat actgggcctt gtggtagttg 25560
 ttttactggg cctttttgta tgatctataa aattcactgg gatcaaccgg gagaggaatg 25620
 gcagcagatg cagtccccag ggtcctcgt cgccgcctga gcacccggca cccgcgctga 25680
 accggagagg gacgcgcgga cgccgtgcag ctggtgcgga gggggctgtg gcagatgagg 25740
 atgagacgag tacgtggctg ggaaggccag caggccaccg ggtcttcgtc cagcccgagg 25800
 cgagtggaca ggactagaga tggcaacggt taaaaaccgg ctgggtttta ccgtcccaaa 25860
 cccgtaccgg tgaaaaatat ctatgccat taaaaaccg gtacccatga cgggtttgag 25920
 attttgccca aaccgtacc catcgggtta acgggtacc atgggttacc cgcgggttct 25980
 atctccaata tacctgttct tctcataatc aataagtatc gtaatgatta atgatatcat 26040
 gatccaaaat ctatgtaatg aacaacgagt tcatgatttg gtataaaaat tattagtaga 26100
 gagaatgaaa taaaataat aagttgtata attaatgac cttgcactaa gttatccatc 26160
 catcacatat ataacgctag taaaaactat aatatcaagc aagcaacact ctcaccgact 26220
 actgatacat tcaccaattg ataaaaata tgaagtaaat aaggaataac aagtttggtg 26280
 ttcgtttata aaataaaatg acaatatgca ctaggtttgg tcgggtttta aaaaccacg 26340
 gggtcacggg tttgggtact ataggaacaa acccgtaacc ataaaccat tgggtacaga 26400

tttatgcccg ttaacaaacc catgggtatg aaaattgacc caaacctata ccctaattggg 26460
 gtaaaaaccc atcgggtttc ggatttcggg tacccattgc catctctaga caggacaacc 26520
 tcggccggtc ctgtatgtag gccaccagca tcggccagtt ggtacatcca gccgggggtca 26580
 ggtcactttt actcgtctca atcagacaat caccgtccac caacgaacgc caacgttgtc 26640
 acttgtcagg tcggttgaga cttgtatttt tttttgtcct ccgtaaaaat cagttccaac 26700
 gacagatacc ccgacggtaa gcggacagcg ctgtcgtagt cgttttgttt gagtccacaa 26760
 atgagccgaa gatgcaagca gcatatgcaa cgtgtgttac aaagaaaaga agtggatgca 26820
 aaggcactac gagaatgaac tggtgccacg gaaagatgga accaaaccaa cgaactattt 26880
 tttccctcct tttttttatt aatgcttcgg acgacgatag cagtttctgt acaactcttg 26940
 atatataaaa aacaaacaat atgacggatt aacctaggca tccaatgccc cccaatttc 27000
 ctctgctat agcgccacac cttgctgctg cgacgactgg agccttcctt tgaggaagcc 27060
 cctgcacacc ttgctccaca gctccttgtc cggtgcccgc acgtcgaagc tcgtcttggc 27120
 cacttccacc tggcagtcct gccacaaca aacaaaacaa ggacagatat ttttttttgt 27180
 cctccgtaaa aatcagctcc aacgacagat accccgacgg taagcggaca gcgctgtcgt 27240
 agtcgttttag tttgagtcca caaatgagcc gaagatgaaa gcagcatatg caaggtgtgt 27300
 taaaaagaaa agaagtggat gcaaaggcac tacgagaatg aactgggtgcc acggaaagat 27360
 ggaaccaaac caacgaacaa ttttttcct cttttttttt tattaatgct tcggacgaag 27420
 atagcagttt ctgtacaact cttgagttct gaagcacata taataaaaaa caaacaatat 27480
 gacggattaa cctaggcatc caatgcccc caatttcctc ctgctatagc gccacacctt 27540
 gctgctgcga cgactggagc cttcccttga ggaagcccct gcacaccttg ctccacagct 27600
 ccttgctccg ctgccgcacg tcgaagctcg tcttggccac ttccacctgg cagtctgcc 27660
 aacaacaaac aaaacaagga cagatatttt ttttccatgt cacagacaga cagacagaca 27720
 gacagacaga gagacaaacg aacactcggc acgctgtcgt tactattatg attaattacc 27780
 agtatgtggt tgtggcggag gaggcggtcg gcgatgctca tgaggacgtc cttgctgtac 27840
 tccgggtggc cctggacgcc catggcgcgg ccgccgaggc ggaacatctc gacgcgggtc 27900
 ttgtcggacc gcgccagcgc ctccggcgcg gggggcagct cccacacctc gtctggtgg 27960
 aactcgatca ccggcatgtg cacgggcagc ttacgcggcg cgaacagccg cgccgccgcc 28020
 gccgtcgggt ggatgcagct caccgccgat tcccagccct tggccgaccg ccccgctgcgc 28080
 ccgccagcg ccgggcacag gatctgcgtg ccgcaatcaa acagcttcag gagttaagac 28140
 ggaagtgtag tagccacagg agtttagagg tacgtgtgcg taacgtggac gcgtgcaagt 28200

ctgcctggca tcggcgcccc accaccgaca gggccgatgg acgcaactaa aacgttttct 28260
 tcgggaacac gccaaagtaat tgattcatgt gcacacagac tgtccccctt ctgtttgtag 28320
 tacgatattg ggaacctcct aggattccac tgctaaacaa ttgggtgtctc ctgttcctgc 28380
 gtacgagtac gacgacggaa gacttcgcgg ccacaagagc aatccaaatc caaggctctg 28440
 gctctcggac cacagggaca gcgacagtgt aagagctctt tgaagttgcg agtgttatta 28500
 acatagaacc aagtaataat taggagaaga ggtcagtagc tcctcacgcg tcgaggcacg 28560
 tctctgacaa aagcgtggtt cgcgcgggcg attgcgtgcg cttgggcttg ggcgctaccc 28620
 gcacgccctt gggcgtgatc tgatccccctg agctgctggg ttggtacgct agtagcatcg 28680
 tcatcccaaa agcaatctcg ctcggcaggc gagatgcgtc acgccatttg cgttcttcgt 28740
 cctcctcctc cttcccgggg gatttgattt taaaatttgc aggcgcggtt tacgcgccac 28800
 tttgaggcaa acaaaccggc gaaccggaat aggggaaccg ctcgctcctc taagccaggg 28860
 caggggcgca gggctctgtg actgtgagcc aaacgtccgg ccacagacgc agcgggccgt 28920
 aggagatcct gcagaacaga taccactcc acttgtctgt gtgccaacaa caacagcaac 28980
 ccagctgcca cggccacgtc acaccacgtg aatcagcgat gtcagcctcg agccttaacc 29040
 ctttgtttga gagatgctgc cgtgtcttaa acctagatta gcgtggagtt tgtagtcact 29100
 aatccatcca atcagtcccg tgtccgtctg tttgcttcga cccgaatcaa accagggggc 29160
 tctgtctteta tgaactgaac tggcatggac tgaacaacaa cagcgtcatg gcagaagcaa 29220
 gagctctata ttgtgcgtc taaatggaga ttggtaaaac tcgtagaatt gggggttcgt 29280
 ttcttccgtc aaactctaac tgtgggcttg atgctagcac tgagtcacct ttgtcattct 29340
 ctggggaaaa aaaataaggc atctttccgt cccattgct actgctcacc aattaagcag 29400
 ccagtaccgt ttgtactagt caaatgcat caagaacgac cacgggtcgc cgtaaaaaaa 29460
 aagaaagaaa ataatagaaa agaaaagggtg cgccgggtgg acgggaaggc gctaggctag 29520
 aagagcggca gccccaccag gtggtgcccc cagcgtcccc cggtcccgtg attcaccagc 29580
 gacgacggag aaaccagct acgcgcggaa gggactagac gagaaccaac cgcaccgcac 29640
 ctaaacccaa ccaaacagca agtcgaacca aacatggacg gatgggatgg gcacctggtg 29700
 gccgaagcag acgccgagga cgcgcttgcc ggcggcgtgg acgcggcggg tgaggtcgac 29760
 gagcgcgagg atccagggtc cgtcgccgtg cgcgtcggcg cagctcccgg agatgacgaa 29820
 cccgtcgaac ccggctgcct cggcgtcggc ggggagctcc ccgcggacgg cgctgtacac 29880
 ccgccacctc tcgccgtcct cctccagcag cgcgcggaag acggcgaagt agccgccgta 29940

cttctgccgc acgtactccg agtcctcgcc gcactgcagc accgcgtacg agccccgccg 30000
 cgagggggcg gcggcgggcg cgggcgggcg ctccagcgcg gccgacgcgg cgttgctcag 30060
 cgccccatt cccatggctg gcggcgctgc ggccaggcag gcgcgtctcc ggccccggaa 30120
 tggaggcggg ggttgggctg cgcttggctt ggctgactcg cttgcggggg gtgagaggtg 30180
 gcggggagga tggggggaga acggcgaggc gaggcgaggc cgatatatta agtaagcacg 30240
 agcggttttc cctcggattt tttttatttt ttctgcgctg gttttccatt ttgctattat 30300
 agtactgttt ctgttttttt ttactggtac tggggctggc cgctaccggc ctaccgctaa 30360
 catttggtat ggacgtatgg catggcaacg gccagcaggc gcgggacggg ggctaccggc 30420
 gagcgggcgg tttgctcggg tccccttcac tgctcgggtc tttggccggg tcctagtaat 30480
 ggggtaccaa aatcgggtat ccgatagata aaaatcctat tagagcatgg atgtagcgaa 30540
 ttttaatatc tatggatatt ttattaggtc atttattaaa tttcactcgc tcatgcatac 30600
 aatatactta acaagcaaag aagacaaacg tggaccctt aatctcacct ttaaaacata 30660
 tattgataaa agagtttttt tttctagacc gatcttgta aatactgtat ctacctgct 30720
 gataaaagat tcaaacagga agagcaaaag cgtatatcaa attaattgac acgggagtcc 30780
 atttctgtgc tcagagtaag cgagccctac aattgcaaaa aaaagggggg gggggggggg 30840
 atgcatatgt aatatctgat gtcatttata tatagtgcaa cgattctctt tcgtaccaag 30900
 ttgcaagtcc tcatatcgaa tcgtaagtta ttctgttttc ctgtgtacat atgaacatat 30960
 ctatctttta atacaaacag ctttttttat agttttttct aagtacatat gaacatatat 31020
 ctatcttcta atacaaacaa catatttttt gtatagtttt tgttatgatc atatgttttc 31080
 ccatgctacc gtttgtatta aaacacggaa actaaactac actaatttat tttattcata 31140
 tttctttctt taaaaaatg ttttttatcg ttccatctc totatttcaa accgtaagct 31200
 gttctggctt tttttttcta aatgcgtatt ttagttatat ttctagatat aattagagtg 31260
 tacataaaca cataaaaacc cacttactaa aatcacaaca acttacagca atttaaaacc 31320
 gtgagattgc cgagcagggc gagaaccgac tgtagacat gtcacatgc atgtctggg 31380
 cattgttga ttttatttgc ccgagaaatt gctctgtttt cattcgtaga atttgtacta 31440
 gtattttctt accgaggctg gctgggcata cgtgcacgcg cgcgatcgtg cagcgacatg 31500
 cacatgcaat gcaatcaccg cgtgacggag taccgaggcg aggtcgtcga ccacgtgccg 31560
 tatgggcccgc tggcacgtga caccaccgat tcggatcctt atttattcat tcatttgtca 31620
 gtccccacgc attgtattta aaaattcaga aacgtaagcc cacttttacg caaaaacaac 31680
 tttactgtcc gaaacgcctt gtgcaactag ctaggctagg aggctaactc attagtaaaa 31740

tgttgtgttt tccacccttc ctttgtacta attttataga ctattagccc ggacgagctg 31800
 gctaggccag acagggaaat tatattttac tttgacgcct catctggatc attggaattg 31860
 aattccattc taacaatatt aatttaggta tatatcaatt aagctaatacc ggttttatgc 31920
 aaaatatatt tatatactat tattagcaag atgtcggaga ttttatgtg ctacattttt 31980
 actataaagg agtgaaacga agagtgtcat gtaaattaca gactagaaac gaattctact 32040
 aatgcataaa atcatttcac aactccacc ccatgaattt gagatagcct tatatctgaa 32100
 ctttgaaaag tgggtggaatg tcaaattcca aactaaataa gttattttat tgagtgaatt 32160
 ccaattcctc taaaatgaag ggatccaaat gccccgtgac tggaatttgg agacgaagcg 32220
 cgcgcagaat attcgggtca aatagaatca gctacatact atgtgcatta gggctcacat 32280
 aaataatcca tatcttgagg agtatcaaga gagtaagtgt aaaaaaata caagagacat 32340
 atcttgatga agagatgtat ctagctcagt tctctaagtc tagatacagt ttogtccata 32400
 caaccacat aatgagtta tatcatgaga gattctagtg aataagatat atgattatat 32460
 acaaaaatag tttcttatat gtttttttgt attttgaaaa ccgaactgga gtcttaaggt 32520
 tgcacatgcc ctggatgtat ctagtgtttg taaaacctgt ttgtaaaacc gcaacaaagt 32580
 ttctacattg tacatgcct tagggatgtt accaattttg gtagtgaaac gcaataatga 32640
 attaagcaat aattcaagcg gatcagaatt aatgagacg tgtggtgtag actgtagaga 32700
 gtactctacg atatgtagtg ggatacttgg agcagtaatt attactaaac atgagggtga 32760
 gtaaacattg acgggataac gctgcacatt aaatactagt atcagtaaac gatgcaatat 32820
 gcacgatcat ggtccgagag aatattcgga tcaacacatc tatctcctgc gtttatatat 32880
 tattaact gaacgttacc gttttttgtt agtagtgata aagatcgatt aaggtaactc 32940
 cagcaacgtt ggatgtgtat aacactgttt tgtattgtag atgtactctt tttatataag 33000
 gagaagtta aaatagaaat tacgataacg taaagtgggt tttaccggc taaatttgaa 33060
 cgttttccct ttccttccct ggtcctgtac ttgcagtatt gactgtcgc ctgtcggttc 33120
 atcgatcgga acgacgacgt cgtcgcgcgc ggcactatgg gactagtac tttggtggca 33180
 gtggcacacg ttcgtagtgt gtgtcacttt ggtgtctgga gcctgctgga gcaagacagc 33240
 aagtcaggct gaggccggct actcagctgg gcgagtgggt gttgctgca gctttggcgg 33300
 atatcagggt atgcatatat ggcaacggct ccaaaaacgc gctgctgca ctgcgatgcc 33360
 ctgcagcatt gcaatggctg gccggccgggt gcgcgttgct tggaagaaag atgctgtccg 33420
 gtcggcgaac cagcctcgat cagccatgcg gttgtgatgc atgcgatgc ttaacagtct 33480

ggaccctaac acgggctggg tgaagctgaa gaggaccta tttttggtag ttttgtttga 33540
 ctgaattatt ggtagttaag ctagattagt cctacttttg ggccggggct ggctttctgg 33600
 cctagctcaa cacataattg tttttttttc tccatacggg cggcgtacat gcgttcaaatt 33660
 tttaaacctt gaccttttac ttttattcac gtacgggtgta ctgaacccgc cgtagtcagg 33720
 tagaaaaaag tttaaaaatg agagacacga cctcatgtta accgtcaccg gtgcatcatc 33780
 gatggacgta cgttgacagc atcacaacga ctacaaaaat atcaaataat gcatgttaatt 33840
 ctgattctta gtatagcctt tcgggtgctgg caaattgcaa tgccgtgtgc cactatgttc 33900
 attctcaaaa aaactgacca attgacgccg gactaatgct ggatcaacaa cgaccgcaca 33960
 agtcgtgata gtaacgggtct agctagtttt cacttttcag agattaattt agagacagct 34020
 agctagctca ttagttagtt agcaaattag ctagttattt gttagttagc taatttcact 34080
 aatatttttt agccaactaa ctatatatat cttcagtgc ttcaaacagt ccctatataa 34140
 tctagattaa tttagttgta gctatttggc atcctagatt aatggaactc agattttcat 34200
 cattagacaa cactgtccac ggtcgtattt cttcattatt tatgatactg tagcagtttg 34260
 taggtacata aaaacgttga acatgttcaa acacattaaa aataaatatt tcatacacat 34320
 tttgtgcccc tatcatacta catttgaaat taaattacat tcttctcgca aataatacat 34380
 tgacaatttt atctagaaaa gtattcgcgg ttccctcttc atctcccaat ccggtatcgt 34440
 gatgacttga tggatattta tcgttgctgt cttcatcaca tcaatcaaat agttcttccc 34500
 gtatatgtta ctacctcaa tgaaaaaatt attccttcaa cattggataa cttggtaagt 34560
 ccaataaaat tatgaatttc atcttcgaga cagcgaaaga ttgctcaata tgataagtgc 34620
 aattggttga atacatctca tcatcacatg tcagtcaatt aattagtcga tcaacgatga 34680
 aaattaagcc ctgaggttca ccgtgctaca aaacgacatg attgtgtgta cagttttcgt 34740
 actatttaag ttttacctcc ttctatatg aaacataatt cctcaacgat tgtttgcttc 34800
 ggattaaagc ggactattta gattggtgta ggtgtaattc ataaaaacaa aagtactata 34860
 gaaccagtag aaaccggtat agattaaagt caagggaacg actgaaagtc cacaaagcta 34920
 ctggattcca tgagcttctg tagataacaa gcccgacatg gcgacgtcca catgggcccg 34980
 gtctgaaaat tcccttccca gcaaataaag agaaactagc aaattgttca tatatgctac 35040
 ggttctatatt atacttatgt atagaatata aaatataaag atatgagtgt attgttagtt 35100
 atgtggatat gaatgtgagt ttagagctaa taatcatagt tcgaatctct atttgtatat 35160
 aatttttagca tttttataat ttaaattgtga ggtatacgat gaaaatcata aaactaggaa 35220
 aattagtggt ttaatatagt acagatatta ttctctgaac caaagacaca caccagaata 35280

caactcacat atgcattgca cgtgtgaagc tccgacacac agggcgcaac aactcagctg 35340
 ctttctttac gtgatcagat tgctagagta cttcacaaaag ggacgccgag agagtatcgt 35400
 tcaccaacct ggagtgaggca gttgccgcat tgtactagtg taaaaagcc cagctgaacg 35460
 gtgatcagtg gcctcccaat gccattctgt gtaggcgatc acagatctat caacaccacc 35520
 aaaccaagc cagcacactg caaacacca aaaggattga agcaagctgc caaatggcac 35580
 gcgttgacag aacaccgacc ctgcctgatt cagagtcaga aatgcaatta tagacgagtc 35640
 tatgggcatt gtcactgaca gaatgacagg gcaaagatac cacagtttca cgcgaaaaca 35700
 tggccgtggc acgttggccg ctcgaggcaa caacttctat attggcatag ccagaatgat 35760
 aatattgttg tacaactcag ttagagatcg agtcgcacga tcatgctcgc actctctgat 35820
 tagggacgta acaatctgtt ggttaataag ttctcctttc ataccacata ataaatagtc 35880
 aaagaaccga tacgcgaacc aacattcata ccgagattcg atctaatac taccggccat 35940
 cttttcgact ccccgaacca tagccggagt ggccatgggc atttctccgc ccttgatcag 36000
 catggcatct ccttccaatt ctggaggtac aaatctatgt tctatgattt ctaatggcta 36060
 ggattacgag tcgaggtctt aaaatctaata agtggtatca aagccatggg tttaggctcg 36120
 ggctctaact ataaatgaca gttttcotta agttttatga caaaatccga gaaaaacacc 36180
 tcttaactct ttgtattcgt gttcctactc acgtagaaca agcaaaaggg gagaaagaaa 36240
 ctctaaccac acatttccac ctttcccaaa ctotaatcct aaggcagtc ataatactgag 36300
 caccacagca cacaaagaaa gggaaagcag acgttaggaa agcagccatg tgctatatat 36360
 tcgaagacct agcctacaca cacatctgtg aaactgtatt aaattgttaa atatttttag 36420
 tttgttaaat atttttaaat tacgttaact cgtcttttct agttattact tatagcttca 36480
 aatctagttt catttacgat aaagttcaat aatcattatc cttctcttga ttactatttt 36540
 catttggtat gaatcatgat cggttgtttt tctctaaatg tttgggtgag taatcttttag 36600
 gcttgacaaa cgaggatggg gaattcattt ttacgcac tcataattatt taaagtgcac 36660
 cacttgatca cgagcacaaa ctgatggca tgtaagtgat tttagggtgt gattgacaca 36720
 caaataggc tattgggagt gacaaacaac tcctcaagtc taaggactaa ataagaatat 36780
 ttagaaaatt agtatatttg gatattctat ttaaaaaccc attgaagctt gatttttggg 36840
 taataacatc ctacattatt tttagggcct gttttgggaa ctagagatgt tctaagggct 36900
 accactcaat tggataccta attagttgtt gactaatctt gattagttgg atgacagaaa 36960
 atagaatgga actaggtaac taagggggtg ttggattaca ctagagataa tagttagctg 37020

ctaaaattag ctgaagacat ccaaacactt tagctaatag ttaaactatt agctatTTTT 37080
 agcaaattag ctaatactcc ctccgatttt tttatttgac gtttgttagt gaaaatctga 37140
 actattgagt gtcaaataaa taaaaatgga ggtagtagtt aggtagacat ttgttaggta 37200
 gctaattaca ctaacaatgt ttagccaact aactattagt tctagtgcac taaaacatcc 37260
 tctgaggtga tgacctgcac gtggtatgac ttaagtcact tggcctcatt agcctaattt 37320
 gcaactctac atgcagccat cgtcctagag ttaattggtc actagttagt tgctaactgg 37380
 tcatagttag ttgtccgtgt gtgctagggg ttctttatac catatagata ggctttatcg 37440
 aaaaaagata tttattttaa cacgatctaa actcatagat tctcatatcg cacaattata 37500
 tttttttatt tttaaattat ttgtatatat atttacaata tcaattctta ggcacaaatg 37560
 aacatgtggg atactgggta gagactcttt gttttgtctc tcaactgagt agcaggattt 37620
 gaacctcat aggtgcgtt ggacgcacgg ccgcgagagt tagacgatcc acgataaaac 37680
 tcatgtttta aggtgtgtt tggttgtaat gatgggaatg agacagaatg aaatgtgatg 37740
 atcctcaaat aaggttgttt agtttagggg caagggttgg aacaagactg tcccagtatt 37800
 gtcccagtta tccctcgaaa ttagagagac gagaggggac gcgaggaaac gtctctgacc 37860
 tggctatccc tatgtgtacc gcaaccaaac gcaccataaa ttaatgatga tgatgcttat 37920
 tgttgttgaa aggttgcaa ccttaactac agcactaacc gccttatcca aggatcaaac 37980
 acaaaaggcc aaacctgtga agatttactg ttgtattaca taattacaag attaccctgg 38040
 aatgtttcgc atgtctgtaa accgaagaaa aatagttggg tccaaacatc ccaggtacta 38100
 gcctgtgtgc acctggcgc gcagaggctg gagttgattt ttcctttatc gaaaaggaaa 38160
 tattttctaag cctctaacca tttttgcatt ctatgcagtg tcacctcatc agagagttaa 38220
 tagttaatca agcctcccaa aaccttcatt tattaatgag ccagtgaaac tacatgatac 38280
 catcatagta agaagttcca tgagtaacag gtcagcagat tcatttttca tttgtgaaac 38340
 tagattaaac aaaatattcc tttgggttga agtttttttt gtctatttga cttttgggtt 38400
 gtaacatgaa caaaaatata ccacctgcaa ctgaaacatt caaagattca aaggtacctt 38460
 cttttggaat gtttacaagc tcaaatgcct ggaggggtctc tgcaagtagg ccattgcctt 38520
 cacttcctaa cactaagcac agagattcat tcaacatcga atcagctagt tctttggaca 38580
 gcgagtagat ttttttggat gcagcactac tactttctgg atggcctgcc atcatcttca 38640
 taccatactt tgtcatcaat gcatgcaggt catgccaggt accagagaca ataggaagct 38700
 gcaaaggggc tccacgggct gcacgaacag cttttccatt gaaaggacca caacaagccg 38760
 gaagaaggaa tactccatcc tgatggcatt tgggttcaga ggttggttaag aggtgtagag 38820

ttggaacagc aaaaactaga gtgttttggtt ttctctattg gagattgtta gtttctatgg 38880
 tgcctaagat cgattcctaa gtccctaata ctaatccgta acagaaagta aaacctcgat 38940
 gacgagtaga tctgatctac tgagatcaat agggaaacac acttttggtg ttgttggttg 39000
 agcgttggtc cagttgccgt cttcataccg ttgccctgca gagaagcagc aggcacgga 39060
 ttcgagccgc tgtgggttgt agcgtttcca ggcactccga cgcttaggtg atggggcctc 39120
 tggggactag ggttttgggg cgaggtacta gtgttagtct ttcttgcgac ctttagtcct 39180
 atatttatag cgttggtgtgc ccggaggctc caaccgaggt taacgtggcc cctctcaatc 39240
 aagggtccgt ttaaggagat agatagttgg gattagccca atctgatcac tgatgaccag 39300
 ctatagagga cacaccaac agagataact aatacatata aatcatgtat tgtgtatcct 39360
 ataaaaaata ttgtgtaccg gaatcagaga taaggaggta aggacatcca tcctatctta 39420
 ctttaagagca gaatcaaatt ctttttagca aaggagaact ggagcacaat gaaatttagt 39480
 ggcattcctc aaattctatg gtagagtagc aagattatth aacactatgc aatgcagcaa 39540
 taatacagtc tgacatactt caataagcgg ccttcagaaa agaataatggc atacccattt 39600
 gaaagcacia gctgatctta tcagtgttcc gaggttacca gggtcctgca aggtaggggc 39660
 accagtgcac catgcttacc atgagacca ctgaacggat atgcataact acatttgctt 39720
 caaacaiaaaa cagcatgcat agattgaatt atgccttgca ttctactccg tccgttcttt 39780
 tttatttgtc acggtttatt agtttagttc aaaaatgaac tagcgggcca caaatattcg 39840
 agaattggata tagtattatt taaggatgac agcaatcatc tctctgcaca atgggtggct 39900
 tgatgggtac tgcatatcct cacctgaatc ccatcaagga ctagaatcct ctttgacaaa 39960
 ctgaacaacc catcaagagc atcccatcct catggctcct gaggtcgcgg aaatggttag 40020
 gcatgtgcat gacagcaatc gcctcgggtg aatcagccga ttgcatcccg gacaccttct 40080
 tcatcaccgc gtcgctgcaa tacacgacat taaaggactc gcgcagcacc tccgggacct 40140
 aggataagca agtaatcgat gacaaggggt agaagcacag gtttaggaag agaagaaacc 40200
 tcgcaggaca tgtaaatatg acaagggcct ggagttgcag aggagtacag gatgggcacg 40260
 aggccgacaa aatttgacca tcacatttggt tatgtttggt taactttcgc atcatatagg 40320
 ataggagtat aggactagga tccatttcaa attatcgtgc atttcataat ggtttctgaa 40380
 gctttgttca ccaagtattc ctatttctcg gctggaattt cacgtttgcg ctgcgaggga 40440
 gtgtttcgtc ttcgactctt cgttcagaca gaccccgccg ggactggagc caagccgctg 40500
 ctacctgccg cacgctgcca ctgtcaggtc cgctcggcac atagcgacac agcgagcgca 40560

aacatttcgt tcgcactggt ttagcaaccg aaacgctcct ctatctaate tcttatatca 40620
 tcccctatatt cataacttate tctacaaaca gtgttatata tagttccacg tcatatatatt 40680
 tccactctac tagaaacatg ttgatttcgc cctgactgt gccacaattt acaatttatc 40740
 taagggttagt aaaaaaaagt tagataaagt atgataagat ggcgaactaa atatacccta 40800
 gcgacacaac agcttggaac aacttcaacc agccctagtt agccactcgt agcttcatgg 40860
 taaagatttt ggataatttt ttacaagttt acacacttca tcacgacaaa gattgtgaat 40920
 gctggatgtt ttggatttt gacaccttta cacacttcat aacgtgtgcc atctattaga 40980
 ggagaaacga gaactgcacg cagcaacgca ccaggctaatt aagtgacaac cgaacaagga 41040
 aaggcgggaa gggggcaacc tggaaaatag agagcagagc agaactttat tctcctctc 41100
 aggaagtgtc cttgtcactc taaacgctaa cagccgaagg aaagaaggct gagagtgaga 41160
 ttggagcca caaaaagata accggcatac tcagaactac atgggtccaa atttgagatg 41220
 gtattcaaat tttagatggc aagggtctctt aggcacagct cattcgtctc ccattgcaag 41280
 ttctagcgcg taatcatctc ttctctgaaa aacaaggagt ccattttatc tcagtgaagt 41340
 gtctaataac ctataatcac actttgcaga tcagaaagta ttgttactca ccaactggccc 41400
 tcgtgcaaag tatctcccga attggagcca atatacctgc aaattgacaa acaacatgct 41460
 ttgaagagcg aatttcctac tacatataga gctagatatt aattaatttc aaaagggtgtt 41520
 ttagactacg tgcttgctc atcttcatct tgagtctcga cttcaacatc gccagatggg 41580
 aaaccaacac acaacaaagc atagccctga aaaggaaacc atacaataga actctaaaat 41640
 ccttaagtac cataactgat aggcaacatc ggacaatgct cctttccact ttagctatga 41700
 atttggattt atccgaattt atagctaagt gtctactatt ttaggacgaa gatagtactt 41760
 tataattggt agctaatttg tattgatgaa catttctatg ttgcttggcc aagaataact 41820
 gatcaataaa aaaatctatt gtcatatctg taacacaaaa aatacaaaat aaattgtggg 41880
 tcacattgca atcataatcc ttctttaaaa gtcgacataa tagttatgca tcaaactcta 41940
 gcaattgccc aggaacattc aggaaattgt acaactagg taactgacta aactggagga 42000
 caggttaaga gtgaaataca acctctcatt tccagacat gtacacaggg aacaataata 42060
 tgtcatgggc acaatactcc aatcgtgctt caactagtgg aagaaaaaat ggatgtacct 42120
 tatcttttag ttctgcagat atcccaagtg cttcaggctg ccttatctgt cctgatttta 42180
 ttcgactgc acagcttggt cagcaacctg attacaaaa tgagttttca attgttatat 42240
 agaccacacg gaacaatcaa ataagagatg ctatccaatc aaaagggtatt catagttaaa 42300
 taatatatca aaagccaatg gcatgggtag tttttttttt aatttatagt tgctataagt 42360

atttgacaaa tagaaagagt cccaaatgag tccaacatgg ttctgactac atattccaaa 42420
 atcaaaaacca acatcacact cccacacgat actatctata tcaacataaa ggaggatgag 42480
 aaatagccaa cattcagttt gcacatattg gagcagctag tgggtggagct tggccataaa 42540
 aagaggacgg accattatga tatgaagtgt aaagagaagg gagacagatt agtatttcat 42600
 cagttccgcc actcaagaca gggcttcacg aggcctctatt tgtaacaaat gaagacgggtt 42660
 caagctgaag ggtgacattc atgcttagca cttagtgtag ctgctactaa ctaggcacgac 42720
 ataatgagtc gcccaatagc ttactgtcat gtacggccgc acttacaggc gccgtcgtga 42780
 cgccaggagg gctgcagatc gcgcagccaa ggcaggcgcc acaatcagtg gctaagttta 42840
 gaaagataag gattagtttc cctcttgcac gccttaatca taggagggat tggttacgat 42900
 tagtttcctt ttcatatgcc ttaataatag gagagattgg ttaagattag tttccttttc 42960
 atatgcctta atcataggaa aggttggttg aaccagaggc tatatatatg ccgtgtaata 43020
 ggctgggaaa taatcaagca agatcaatta tccaaaactg ctcttctcct ttgcctctct 43080
 caagccaccg gtgaggaatc cctcacggtg aaggtctaga gcgcgactac gaactgcgta 43140
 gccgcggtcc agcgacgttg ggcgtcgagg cgcttgacaa cctggtatca gcgtcacgtc 43200
 gatcctcacc caccgcctct tgccctccac catcccttc cagccccacc acctccaccg 43260
 accactccat caccatggct gagcccccca tcaaggacct catggagctg atgcagtctt 43320
 tccaaaccga gttggctgcc gtgaaagcca ccatgaagga caagtcgtcc tcgtcgtcca 43380
 ccgacggcgg cggcgagcgc gaggatcccc ctctgttgga tcggcccccc aggttccaga 43440
 agctcgactt tccccggttc gatggcacca ccgacctgat gctcttcac aacaaatgtg 43500
 aatcctattt tcgccaacag cgcaccatgg cggaggaacg cgtgtggatg gcctcttata 43560
 atctggagga cgtcgcgcag ctgtggttca tccagctgca ggacgacgag ggcacaccat 43620
 cctgggggag gttcaaggac ctctcaatc ttctgttcgg gccaccactc tgctcagcgc 43680
 ccctgttcga gttggcggag tgtcgccgca ccgggaccgt ggaggaatac tccaaccggt 43740
 tccaggccct gctgccgcgc gcgggtcgcc tcacggaggg ccagcgtgtc caactctaca 43800
 caggcgggtc cttccccca ttgagccacg ttgttcgcat ccacaaccg gagacacttg 43860
 atggggccat gagtctcgcc cgtcaagccg agcagctgga gttggcacgg ggaccgccac 43920
 cggccgccag gggagccct cgctctcttc cccagcgcc gcgcgccaaag cagccgctgc 43980
 tcgccctccc tgcaccacc gcgggcgcgc cccagccgcg accagagggt ccgcccttga 44040
 agcggctatc accggaggaa caggcggaac ggcgcgcct cggcctctgc ttcaactgca 44100

atgagccgta caaccgcggc cacaaccgtg tctgccgccg catcttctac ctccatggcg 44160
 tcgagctcac ggccgctgcc gaggaactcg taggggacga cccgcaggac ggcccccctg 44220
 tcttctccct cagggcagtc actggcatgc ccatctgcaa ttccatgcag gtgcgggcca 44280
 ccctaggcgc caccaccctc ctgcgcgtcc tggacaccgg ctccacgcat aacttcattg 44340
 gggaggatgc cgcccgccgc accggcctgc cgatccagcc gcacctcacg gccactgtgg 44400
 ccaacggtga acgtgtcacc tgcccaggag tcattcgccg cgcccaggtc atcatcgagg 44460
 gcgagccatt cttcatcgac ctcttcgtca tgccgctcgc agggtagcac ctcgtcctag 44520
 ggactcaatg gatggtcacc cttggtcgca tgggtgtgga cttcgtcgac cgctccgtct 44580
 ccttcctgca ccaaggtcgc caggtctcct ggtcggacgt cgccgaccgt cagcatcccc 44640
 tgctcgccgc taccacgaca ccgagcgccc tccttgagga gctcttgac tccttcgacg 44700
 ggggtgtttgc tgagccggcg ggtctgcccc cacagcgagc tcgggaccac gccatcgctc 44760
 tcaagccagg ctctacacct gtggcggtcc ggccgtaccg ctacccggtg gcgcacaagg 44820
 atgagttgga ggggcaatgt gccgccatgt tgaccaagg catcgtaac cgcagtgact 44880
 cggcgttctc ctaccgggtt ctgctggtca agaagcacga cggggcttgg cggttttgcg 44940
 tggactaccg cgcccttaat gccctcaccg tcaaagacgc cttccccatc cccatcgtcg 45000
 acgagctcct tgacgagctg catggtgcgc agttcttcac gaagctggac cttcgctccg 45060
 gtgatagtcg cctagagggg ggggtgaatag ggcgaaactg aaatttacia atataaacac 45120
 aactacaaga cgggggttagc gttaggaata agaaacgagt ccgcaagaga gggcgcaaaa 45180
 caaatcccaa gcgaataagc aagtgcgaca cggagatttg ttttaccgag gttcggttct 45240
 ctcaaacctc ctccccgttg aggaggccac aaaggcctgg tctctttcaa ccttccctc 45300
 tctcaaacga tccacggatc gagtgagctt tctcttctca atcacttgga acacaaagtt 45360
 cccacaagga ccaccacaag attggtgttt cttgccttaa ttacaagtga gtttgattgc 45420
 aaagaaggat caagaaagaa gaaagcaatc caagcgcaag agctcgaaag aacacgagta 45480
 aatcactctc tctagtcact atggcggttg gtggaatttg gagaggattt gatctctttg 45540
 gcgtgtctag aattgaatgc tagagctctt gtagtagttg ggaagtggaa aacttggtg 45600
 caatgaatgg tgggggtggtt ggggtattta tagcctcaac caccaaaagt ggccgttgga 45660
 aggctgtctg ttcgatggcg caccggacag tccggtgcac accggacagt ccggtgcccc 45720
 ctgccacgtc atcactgtcg ttggattctg accgttgag cttctgactt gtgggcccgc 45780
 ctgggtgtcc ggtgcacacc ggacaggtac tgtttgctgt ccggtgtgcc agcatgggcg 45840
 tttctgactc ctgcgcgcgc agagcgcgca ttaaatgcgc ggcagagagc cgttggcgcg 45900

gagaagaccg ttgctccgga gacgcaccgg acagtccggt gaattatagt ggactagccg 45960
 ttgggggtttc ccgaagctgg cgagttcctg aggccgacct cctttggcgc accggacact 46020
 gtccggtgta caccggacag tccggtgaat tatagcgca gtgcctctgg aaattcccga 46080
 aggtggcgag tttgagtctg agtccccctg gtgcaccgga cagtccggtg cgccagacca 46140
 ggggtgcctt cggttgcccc tttgctcttt tgttgaatcc aaaactgggt ctttttattg 46200
 gctgagtgtg aaccttttac acctgtgtaa tctatacact tgggcaaact agttagtcca 46260
 attatttgtg ttgggcaatt caaccaccaa aattaattag ggactagggtg taagcctaatt 46320
 tccctttcaa tctccccctt tttggtgatt gatgccaaaca caaaccaaag caaatataga 46380
 agtgcataat tgaactagtt tgcataatgt aagagtaaag gttgcttgga attgagccaa 46440
 tgtaaatact tacaagatat gcagggattg tttctttctt atatattatt ttggaccacg 46500
 cttgcaccac atgttttggt tttgcaaatt ctttttgtaa atccatttca aagatctttt 46560
 gcaaatggtc aaaggtaaatt gaataagagt ttgcaaagca ttttcaagat ttgaaatttt 46620
 ctccccctgt ttcaaatgct tttcctttga ctaaacaaaa ctccccctaa aagagatcct 46680
 cctcttagtg ttcaagaggg ttttgatata tcatttttga aatactactt tctccccctt 46740
 ttgaacacaa taggatacca attgataaat actcttgga aacactaagt ttttgaaatt 46800
 ggttggtgtg cggctcctttt tgctttgggc tcatactttc tcccccttg gcatgaatcg 46860
 ccaaaaacgg aatcattaga gcctatcgaa gtactatcgt cccctttggt cataagtaaa 46920
 tgagttaaga ttataccaaa gacgaaatcc ggtcttttag ctttgggttc ttactctctc 46980
 cccaaagaca aggtccttta ttggagcgat ggcgaaggat gagttaccga gtggaagcct 47040
 ttgtctttca ccgaagactc caattccctt tcaatatacc tatgacttgg tttgaaatag 47100
 acttgaaaac acattagtca tagcatatat gattaaaagt ataaatgagc tatgtgtgca 47160
 atctagcaaa agaagttgcg tgaatcaaga atattgagct catgcctaag tttggtaaaa 47220
 gtttgttcat caagaggctt ggtaaagata tcggctaatt gatctttagt gttaatgtaa 47280
 gaaatctcga tatccccctt ttgttggtga tccctaagaa aatgataccg aatggctatg 47340
 tgcttagtgc ggctatgctc gacgggattg tcggctatct tgattgcact ctcatatca 47400
 catagcaaag ggactttggt taatttgtaa ccgtagtccc gcagggtttg cctcatccaa 47460
 agcaattgcg cgcaacaatg acctgcgga atgtactcag cttcggcggt ggaaagagcg 47520
 accgaatttt gcttctttga agcccaagac accaaagatc ttccaagaa ctggcaagtc 47580
 cctgatgtgc tcttcctatt aattttgcac cccgccaat cggcatccga ataaccaatc 47640

aaatcaaattg tggatccccg aggggtaccaa agtccaaact taggagtata agccaaatat 47700
 ctcaagattc gttttacggc cgtaaggtgg gattccttag ggtcggattg gaatcttgca 47760
 cacatgcata cggaaagcat aatgtccggt cgagaagcac ataaatagag taaagaacct 47820
 atcatcgacc ggtatacctt ttgatccacg gacttacctc ccgtgtcgag gtcgagatgc 47880
 ccattgggtc ccatgggtgt cttgatgggc ttggcatcct tcattccaaa cttgcttaga 47940
 atatcttgag tatactttgt ttggctaagg aaggtgccct cttggagttg tttgacttgg 48000
 aatcctagaa aatacttcaa ctccccatc atagacatct cgaatttctg tgtcatgac 48060
 ctactaaact cttcacatgt agactcgta gtagaccaa atataatata atcaacataa 48120
 atttggcata caaacaagtc attttcaaga gttttagtaa agagtgtagg atcggccttg 48180
 ccgactttga agtcattagc aataaggaaa tctctaaggc attcatacca tgctcttggg 48240
 ggcttgcttg agcccataaa gcgcctttga gagcctatag acatgggttag ggtactcact 48300
 atcttcaaag ccgggaggtt gctcaacata gacctcttc cttgattggc cgttgaggaa 48360
 ggcacttttc acgtccattt gataaagctt aaagccatgg taagtagcat aggctaataa 48420
 tattcgtatt gactcaagcc tagctacggg tgcataggtt tcaccgaaat ccaaaccttc 48480
 gacttgggag tatcccttgg ccacaagtgc tgctttgttc cttgtcacca caccatgctc 48540
 atcttgcttg ttgcggaaga ccattttggt ccctacaaca ttttgggtta ggacgtggaa 48600
 ccaaattgca tacctcattc ctcgtaaat tgttgagctc ctcttgcatc gccaccacc 48660
 caatccgaat ctgaagtgc tctctatcc tatgtggctc aatagaggaa acaaaagagt 48720
 aatgtcaca aaaatgggca acacgagatc gagtagttac ccccttatga atgtcgccga 48780
 ggatgggtgc gacgggggtga tctcgttgta ttgcttggtg gactcttggg tgtggcggtc 48840
 ttggttcttc ctcatgctcc ttctcttgat catttgcatc tcccccttga tcattgtcat 48900
 tatcttgagg tggctcatct tcttgatttt gcccttcac aacttgagcc tcctcctcat 48960
 tttgagttgg tggagatgct tgcgtgggtg aggatgattg atcttgtgca cttggaggct 49020
 cttcggattc cttaggacac acatcccaa tggacatgtt ccttagcgct atgcatggag 49080
 cctcttcatt acctatctca tcaagatcaa cttgctgtac ttgagagccg ttagtctcat 49140
 caaacacaac gtcacatgag acttcaacta gtccagtga cttgttaaag accctatatg 49200
 cccttggtgt tgagtcataa ccaagtaaaa agccttctac agtttttaga gcaaatttag 49260
 attttctacc tcttttaaca agaataaagc atttgctacc aaaaactcta aagtatgaaa 49320
 tgttgggctt ttaccgggtt aggagttcat atgatgtctt cttgaggatt cggatgaagat 49380
 ataaccggtt gatggcgtag caggcggtgt tgaccgctgc ggcccaaac cggccgggtg 49440

tcttgtactc atcaagcatg gttcttgcca tgtccaatag agttcgattc ttcctctcca 49500
ctacaccatt ttgttgaggg gtgtagggag aagagaactc atgcttgatg ccctcctcct 49560
caagaaagcc ttcaatttgt gagttcttga actccgtccc gttgtcgctt cttattttct 49620
tgatccttaa gccgaactca ttttgagccc gtctcaagaa tcccttcaag gtctcttggg 49680
tttgagatth ttctgttaaa aagaataccc aagtgaagcg agaataatca tccacaataa 49740
ctagacagta cttactcccg ccgatgctta tgtaagcaat cgggccgaat agatccatgt 49800
gtaggagctc cagtggcctg tcggtcgtca tgatgttctt gtgtggatga tgagctccaa 49860
cttgcttccc cgcctgacat gcgtacaaa tctgtctttt ctcaaaatga acatttggtta 49920
atcctaaaaat gtgttctccc tttagaagct tatgaagatt cttcatccca acatgggcta 49980
gtcggcggtg ccagagccaa cccatgttag tcttagcaat taagcatgtg tcgagttcag 50040
ctctatcaaa atctactaag tatagctgac cctctaacac acccttaaat gctattgaat 50100
cattacttct tctaaagaca gtgacaccta catcagtaaa aagacagttg tagcctatth 50160
gacataattg agaaacagaa agcaagttgt aatctaaaga atcaacaaga aaacattgga 50220
aatagaatgg tcaggagata tagcaattht accaagtcct ttgaccaaac cttgatttcc 50280
atccccgaat gtgatagctc gttggggatc ttggtthtct tcatatgagg agaacattct 50340
tttctcccca gtcatatggt ttgtgcaccc gctgtcgagt atccaacttg agcccccgga 50400
tgcataaacc tacaaaacaa atthtagttct tgactthtagg tacccaaact gthttgggtc 50460
ctthggcatt agaaacaaga actthgggta cccaaacaca agtcttgga ccttggtt 50520
tgcccccaac aaacttgga actactthgc cggattthgt agtcaaaaca taggatgcat 50580
caaaagthtt aaatgaaata gcatgatcat ttgaagcatt aggagthtct tthctaggca 50640
acttagcacg gthtggttgc ctagaactag atgtctcacc cttatacata aaagcatggt 50700
tagggccaga gtgagacttc ctagaatgag thctcctaath ttgtcttca ggataaccgg 50760
caggttacia aatgtaaccc tcgttatcct gaggcattgg agccttgccc ttaacaaagt 50820
tggaacaagt cthaggagg gcatthaagt tgacattgtc tcccctthgg aagccaatgt 50880
catccttaath gccggggcgt ctcccattat aaagcatgct acgagcaaath ttaaththct 50940
cattctctaa gthtggtctg gcaaththtag catctagtht thttatatga tcatththgt 51000
gthtaathaa agccatatga tcatgaatag catcaatath aacaththta catctagthc 51060
aaatagtgac atgctcaatg gtggatgtag atggtthtga agaathaaagt tcaacaathct 51120
tagcacgaag tatatcathc thtctctctaa gatcagaath tgtaaththt caaacathaa 51180

27115

aatcttttagc cttagcaatt aaattttcat tttctaattc aaggctagca agagatacat 51240
tcaattcatc aatcttaaca agcaaataca cattatcatc tctaagattg ggaattgaaa 51300
catcaccaaa tatgtgaatc aaccttaa 51328

<210> SEQ ID NO 107

<211> ĐỘ DÀI: 58

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Zea mays

<400> TRÌNH TỰ: 107

cactgtgcgt cctctgcagg cagttgttga catgagcgca tcgtcactgc tgaatcgc 58