



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

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

(11)



1-0027225

(51)⁷ C12N 5/14

(13) B

(21) 1-2014-03694

(22) 10/04/2013

(86) PCT/US2013/036011 10/04/2013

(87) WO2013/158442 24/10/2013

(30) 61/635,945 20/04/2012 US; 13/830,403 14/03/2013 US

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/02/2015 323A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

800 North Lindbergh Blvd. St. Louis, Missouri 63167, United States of America

(72) AHRENS, Jeffrey (US); CHERIAN, Shoba (IN); LOIDA, Paul, J. (US);

LUTFIYYA, Linda, L. (US); WU, Wei (US); XIE, Jiali (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN ĐIỀU BIẾN SỰ BIỂU HIỆN GEN Ở THỰC VẬT, THỰC VẬT,
TẾ BÀO THỰC VẬT VÀ HẠT CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY

(57) Sáng chế đề xuất phân tử và cấu trúc ADN, và trình tự nucleotit của chúng, hữu dụng để điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật. Sáng chế cũng đề xuất thực vật, tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, và hạt chứa phân tử ADN liên kết theo kiểu hoạt động được với các polynucleotit phiên mã được khác loại, cũng như phương pháp sử dụng chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực sinh học phân tử thực vật và kỹ thuật di truyền thực vật. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phân tử ADN hữu dụng để điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các yếu tố điều hòa là các yếu tố di truyền điều hòa hoạt tính gen bằng cách điều biến sự phiên mã của một phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được. Các yếu tố này bao gồm đoạn khởi đầu, đoạn dẫn, các intron, và các vùng 3' không được dịch mã (3' UTR), chúng hữu dụng trong lĩnh vực sinh học phân tử thực vật và kỹ thuật di truyền thực vật.

Cây trồng chuyển gen biểu hiện các gen chuyển tạo ra ưu điểm cho thực vật trong quá trình nảy mầm trong điều kiện lạnh và ẩm đòi hỏi các yếu tố điều hòa có mô hình biểu hiện trong mô có lợi nhất cho việc biểu hiện các gen chuyển này. Các yếu tố điều hòa này cần được biểu hiện đầy đủ trong hạt đang phát triển để dự trữ sản phẩm chuyển gen mà có thể nhanh chóng hoạt động khi hạt nảy mầm trong điều kiện lạnh và/hoặc ẩm, cũng như biểu hiện được trong các giai đoạn nảy mầm sớm và hình thành cây con. Các trình tự khởi đầu của phôi ngô được ưu tiên được mô tả trong WO 2005/113771.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, mục đích của sáng chế đề xuất các phân tử ADN chứa yếu tố điều hòa thể hiện mức biểu hiện cao hơn trong quá trình phát triển và nảy mầm của hạt và có thể được sử dụng để điều chỉnh sự biểu hiện các gen chuyển mà có lợi trong điều kiện nảy mầm lạnh và/hoặc ẩm.

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN chứa yếu tố điều hòa gen để sử dụng ở thực vật. Sáng chế cũng đề xuất tế bào thực vật, thực vật, bộ phận của thực vật và hạt chuyển gen chứa yếu tố điều hòa này. Các trình tự này được tạo ra với liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được. Phân tử polynucleotit phiên mã được có thể khác loại so với trình tự điều hòa được đề xuất trong bản mô tả.

Do đó, trình tự của yếu tố điều hòa chứa trong phân tử ADN theo sáng chế được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra và sử dụng yếu tố điều hòa, catxet chuyển gen chứa phân tử ADN theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó trình tự này có hoạt tính của trình tự khởi đầu; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu, trong đó trình tự này được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại. Theo một phương án, đoạn này chứa trình tự ADN SEQ ID NO: 2. Theo một phương án, phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại bao gồm gen mong muốn về mặt nông học. Theo các phương án khác, gen mong muốn về mặt nông học tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc kháng sâu bệnh ở thực vật.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN khác loại bao gồm trình tự được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu, trong đó trình tự này được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại. Theo các phương án, tế bào thực vật chuyển gen có thể là tế bào thực vật một lá mầm hoặc tế bào thực vật hai lá mầm.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất thực vật chuyển gen, hoặc bộ phận của nó, bao gồm phân tử ADN được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có độ tương đồng ít nhất 95% to any of SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu, trong đó trình tự này được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất cây con của thực vật chuyển gen, trong đó cây con hoặc bộ phận của nó chứa phân tử ADN được mô tả trên

đây. Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất hạt chuyển gen, trong đó hạt này chứa phân tử ADN như được mô tả trên đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất catxet chuyển gen chứa phân tử ADN được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, 6, và 8, trong đó phân tử ADN này được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại được liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 10, 11, 12, và 13. Theo một phương án, catxet chuyển gen chứa phân tử ADN có trình tự SEQ ID NO:1, trong đó nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR có trình tự SEQ ID NO:10. Theo một phương án khác, catxet chuyển gen chứa phân tử ADN có trình tự SEQ ID NO:6, trong đó nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:11 và 12. Theo một phương án khác nữa, catxet chuyển gen chứa phân tử ADN có trình tự SEQ ID NO:8, trong đó nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:12 và 13. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa bao gồm bước thu thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của nó chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có độ tương đồng ít nhất 95% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu, trong đó trình tự này được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại, và tạo ra sản phẩm hàng hóa từ đó. Theo một phương án, sản phẩm hàng hóa là protein thể đặc, protein phân lập, hạt, tinh bột, hạt giống, bột, bột mịn, sinh khối, hoặc dầu hạt.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp biểu hiện phân tử polynucleotit phiên mã được bao gồm bước thu thực vật chuyển gen chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có độ tương đồng ít nhất 85% với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu, trong đó trình tự này

được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại, và trồng thực vật, trong đó polynucleotit phiên mã được được biểu hiện.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 – thể hiện mức biểu hiện β -glucuronidaza (GUS) trong mô mầm và nội nhũ của cây ngô chuyển gen đang phát triển mang các cấu hình catxet chuyển gen khác nhau. Mỗi cấu hình catxet chuyển gen bao gồm trình tự mã hóa GUS được liên kết theo kiểu hoạt động được với nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO:6) và EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO:8) và các 3' UTR T-Os.CLUS33428_1-1:1:1 (SEQ ID NO:11), T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:12), và T-Os.Ara5-1:1:1 (SEQ ID NO:13), như được thể hiện trong Bảng 3 của Ví dụ 3.

FIG. 2 – thể hiện mức biểu hiện β -glucuronidaza (GUS) trong các mô chọn lọc của cây ngô chuyển gen mang các cấu hình catxet chuyển gen khác nhau. Mỗi cấu hình catxet chuyển gen bao gồm trình tự mã hóa GUS liên kết theo kiểu hoạt động được với nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO:6) và EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO:8), và các 3' UTR T-Os.CLUS33428_1-1:1:1 (SEQ ID NO:11), T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:12), và T-Os.Ara5-1:1:1 (SEQ ID NO:13), như được thể hiện trong Bảng 3 của Ví dụ 3.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 – trình tự nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã hoặc EXP, EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1, bao gồm trình tự khởi đầu P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:3), liên kết theo kiểu hoạt động được ở đầu 5' với trình tự dẫn L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4), được liên kết theo kiểu hoạt động được với intron, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO:5).

SEQ ID NO:2 – trình tự khởi đầu, P-Zm.Nac-1:1:2.

SEQ ID NO:3 – trình tự bao gồm trình tự khởi đầu, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:2), được liên kết theo kiểu hoạt động được ở đầu 5' với trình tự dẫn, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4).

SEQ ID NO:4 - trình tự dẫn, L-Zm.Nac-1:1:1.

SEQ ID NO:5 - trình tự intron, I-Zm.DnaK-1:1:1.

SEQ ID NO:6 – trình tự của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã hoặc EXP, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1, bao gồm trình tự khởi đầu, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:3), được liên kết theo kiểu hoạt động được ở đầu 5' với trình tự dẫn, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4), được liên kết theo kiểu hoạt động được với intron, I-Os.FBA-1-1:1:1 (SEQ ID NO:7).

SEQ ID NO:7 - trình tự intron, I-Os.FBA-1-1:1:1.

SEQ ID NO:8 – trình tự của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã hoặc EXP, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1, bao gồm trình tự khởi đầu, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:3), được liên kết theo kiểu hoạt động được ở đầu 5' với trình tự dẫn, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4), được liên kết theo kiểu hoạt động được với intron, I-Os.Cab-1-1:1:1 (SEQ ID NO:9).

SEQ ID NO:9 - trình tự intron, I-Os.Cab-1-1:1:1.

SEQ ID NO:10 - trình tự 3' UTR, T-AGRtu.nos-1:1:13.

SEQ ID NO:11 - trình tự 3' UTR, T-Os.CLUS33428_1-1:1:1.

SEQ ID NO:12 - trình tự 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1.

SEQ ID NO:13 - trình tự 3' UTR, T-Os.Ara5-1:1:1.

SEQ ID NO:14 - trình tự mã hóa gen đánh dấu β -glucuronidaza.

SEQ ID NO:15 – trình tự của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã hoặc EXP, EXP-CaMV.35S:1:1, bao gồm trình tự khởi đầu 35S và trình tự dẫn của virut khảm súp lơ (cauliflower mosaic virus - CaMV).

SEQ ID NO:16 – trình tự của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã hoặc EXP, EXP-Os.Act1:1:1, bao gồm trình tự khởi đầu actin 1, trình tự dẫn, và intron của cây lúa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen có lợi từ các loài thực vật, trong đó phân tử ADN này chứa yếu tố điều hòa. Sáng chế cũng đề xuất tế bào thực vật, thực vật, và hạt chuyển gen chứa phân tử ADN này. Trình tự nucleotit của các phân tử polynucleotit này là SEQ ID NO: 1, 3, 6, và 8. Bản mô tả bộc lộ việc thiết kế, dựng cấu trúc, và sử dụng các phân tử ADN này. Các phân tử ADN này có khả

năng, ví dụ, tác động đến sự biểu hiện phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được trong các mô thực vật, và do đó điều hòa có chọn lọc sự biểu hiện gen hoặc hoạt tính của sản phẩm từ gen được mã hóa ở thực vật chuyển gen. Bản mô tả cũng bộc lộ phương pháp tạo ra và sử dụng yếu tố điều hòa, cấu trúc ADN chứa trình tự khởi đầu và/hoặc các trình tự nucleotit được bộc lộ khác, và phương pháp để tạo ra và sử dụng chúng. Sáng chế cũng đề xuất tế bào thực vật, thực vật, và hạt chuyển gen chứa yếu tố điều hòa liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được, cũng như tế bào chủ được biến nạp.

Các trình tự ADN theo sáng chế được tạo ra với liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được. Phân tử polynucleotit phiên mã được là khác loại so với trình tự điều hòa được đề xuất trong bản mô tả. Do đó, trình tự của yếu tố điều hòa chứa trong phân tử ADN theo sáng chế được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại.

Các định nghĩa và phương pháp được đưa ra để xác định sáng chế rõ ràng hơn và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này trong việc thực hành sáng chế. Trừ khi được quy định khác, các thuật ngữ cần được hiểu như thường dùng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực liên quan.

Phân tử ADN

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “ADN” hoặc “phân tử ADN” chỉ phân tử ADN mạch kép của hệ gen hoặc nguồn gốc tổng hợp, nghĩa là polyme của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc phân tử polynucleotit, đọc từ đầu 5' (đầu trên) đến đầu 3' (đầu dưới). Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trình tự ADN” chỉ trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng trong bản mô tả tương ứng với danh pháp thuộc Đề mục 37 của Bộ luật Liên bang Mỹ (United States Code of Federal Regulations) § 1.822, và nêu trong các bảng của tài liệu WIPO Standard ST.25 (1998), Phụ lục 2, Bảng 1 và Bảng 3.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “phân tử ADN phân lập” chỉ phân tử ADN tách ít nhất một phần khỏi các phân tử khác thường có liên quan đến nó ở trạng thái nguyên bản hoặc tự nhiên của nó. Thuật ngữ “phân lập” có thể chỉ phân tử ADN tách ít nhất một phần khỏi một số axit nucleic mà thường lẫn với phân tử ADN này ở trạng thái nguyên bản hoặc tự nhiên của nó. Do đó, các phân tử ADN được dung

hợp vào trình tự điều hòa hoặc trình tự mã hóa mà chúng thường không liên quan, ví dụ bằng kỹ thuật tái tổ hợp, được xem là phân lập trong bản mô tả. Các phân tử này được xem là phân lập khi kết hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc có trong dung dịch axit nucleic với các phân tử ADN khác, trong đó chúng không ở trạng thái nguyên bản của mình.

Phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết rõ có thể được sử dụng để phân lập và xử lý phân tử ADN, hoặc đoạn của nó, như bộ lô trong sáng chế. Ví dụ, công nghệ phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) có thể dùng để nhân phân tử ADN ban đầu cụ thể và/hoặc tạo ra các biến thể của phân tử gốc. Các phân tử ADN, hoặc đoạn của chúng, cũng có thể thu được bằng các kỹ thuật khác, như bằng cách tổng hợp trực tiếp đoạn bằng phương pháp hóa học, như thường được thực hiện bằng thiết bị tổng hợp oligonucleotit tự động.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “độ tương đồng về trình tự” chỉ mức độ mà hai trình tự polynucleotit được sắp thẳng hàng một cách tối ưu hoặc hai trình tự polypeptit được sắp thẳng hàng một cách tối ưu đồng nhất với nhau. Việc sắp thẳng hàng trình tự tối ưu được thực hiện bằng cách sắp thẳng hàng thủ công hai trình tự, ví dụ, trình tự đối chứng và trình tự khác, để tối đa hóa số nucleotit khớp nhau khi sắp thẳng hàng trình tự với các đoạn nucleotit chèn, bỏ đoạn, hoặc quãng trống bên trong. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trình tự đối chứng” chỉ trình tự được đề xuất dưới dạng trình tự polynucleotit SEQ ID NO: 1, 3, 6, và 8.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “độ tương đồng về trình tự theo phần trăm” hoặc “độ tương đồng theo phần trăm” hoặc “% tương đồng” là tỷ lệ tương đồng nhân với 100. “Tỷ lệ tương đồng” đối với trình tự được sắp thẳng hàng một cách tối ưu với trình tự đối chứng là số nucleotit khớp nhau khi sắp thẳng hàng trình tự, chia cho tổng số nucleotit trong trình tự đối chứng, ví dụ, tổng số nucleotit trong toàn bộ chiều dài của toàn bộ trình tự đối chứng. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa trình tự mà, khi được sắp thẳng hàng một cách tối ưu, có trình tự SEQ ID NO: 1, 3, 6, và 8, có độ tương đồng ít nhất khoảng 95%, độ tương đồng ít nhất khoảng 96%, độ tương đồng ít nhất khoảng 97%, độ tương đồng ít nhất khoảng 98%, hoặc độ tương đồng ít nhất khoảng 99% với trình tự đối chứng. Các trình tự như vậy được xác định là có hoạt tính của trình tự khởi đầu.

Yếu tố điều hòa

Yếu tố điều hòa là phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen, nghĩa là phân tử mà có khả năng tác động đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được. Do đó, thuật ngữ “hoạt tính điều hòa gen” chỉ khả năng tác động đến phổ biểu hiện của phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được bằng cách tác động đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được đó. Như được sử dụng trong bản mô tả, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã (EXP) có thể bao gồm các yếu tố biểu hiện, như trình tự tăng cường, trình tự khởi đầu, trình tự dẫn, và intron được liên kết theo kiểu hoạt động được. Do đó, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã có thể bao gồm, chẳng hạn, trình tự khởi đầu liên kết theo kiểu hoạt động được ở đầu 5' với trình tự dẫn, trình tự dẫn này lại liên kết theo kiểu hoạt động được ở đầu 5' với trình tự intron. Trình tự intron có thể bao gồm trình tự bắt đầu ở điểm kết nối intron/exon đầu tiên của trình tự nguyên bản và có thể bao gồm thêm đoạn trình tự dẫn nhỏ chứa điểm kết nối intron/exon thứ hai để xử lý đúng intron/exon tạo điều kiện thuận lợi cho sự phiên mã và xử lý đúng bản sao phiên mã thu được. Các trình tự dẫn và intron có thể tác động tích cực đến sự phiên mã của phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được cũng như sự dịch mã của ARN được phiên mã thu được. Phân tử ARN được xử lý trước chứa các trình tự dẫn và intron, mà có thể tác động đến việc xử lý sau phiên mã ARN được phiên mã và/hoặc việc xuất phân tử ARN được phiên mã từ nhân tế bào vào tế bào chất. Sau bước xử lý sau phiên mã phân tử ARN được phiên mã, trình tự dẫn có thể được giữ lại như một phần của ARN thông tin cuối cùng và có thể tác động tích cực đến sự dịch mã của phân tử ARN thông tin.

Các yếu tố điều hòa như trình tự khởi đầu, trình tự dẫn, intron, và các vùng kết thúc phiên mã là các phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen và đóng vai trò không thể thiếu trong quá trình biểu hiện chung của các gen trong tế bào sống. Thuật ngữ “yếu tố điều hòa” chỉ phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen, nghĩa là phân tử mà có khả năng tác động đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được. Do đó, yếu tố điều hòa được phân lập, như trình tự khởi đầu và trình tự dẫn, mà hoạt động chức năng ở thực vật hữu dụng để cải biến kiểu hình thực vật bằng các phương pháp xử lý bằng kỹ thuật di truyền.

Các yếu tố điều hòa có thể đặc trưng bởi các ảnh hưởng đến phổ biểu hiện của chúng (về mặt chất lượng và/hoặc số lượng), ví dụ, các ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực và/hoặc các ảnh hưởng cơ bản hoặc ảnh hưởng khác, như bởi phổ biểu hiện theo thời gian, theo không gian, theo sự tiến triển, theo mô, theo môi trường, theo sinh lý, theo bệnh lý, theo chu lý tế bào, và/hoặc đáp ứng hóa học của chúng, và kết hợp bất kỳ của chúng, cũng như bởi các chỉ thị định lượng hoặc định tính. Trình tự khởi đầu có thể hữu dụng làm yếu tố điều hòa để điều biến sự biểu hiện phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được.

Như được sử dụng trong bản mô tả, “phổ biểu hiện gen” là phổ phiên mã bất kỳ của phân tử ADN liên kết theo kiểu hoạt động được vào phân tử ARN được phiên mã. Phân tử ARN được phiên mã có thể được dịch mã để tạo ra phân tử protein hoặc có thể tạo ra phân tử đối nghĩa hoặc phân tử ARN điều hòa khác, như ARN thông tin, ARN mạch kép (dsRNA), ARN vận chuyển, ARN ribosom, micro ARN (miRNA), và các phân tử tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “biểu hiện protein” là phổ dịch mã bất kỳ của phân tử ARN được phiên mã thành phân tử protein. Sự biểu hiện protein có thể đặc trưng bởi chất lượng theo thời gian, theo không gian, theo sự tiến triển, hoặc theo hình thái của nó, cũng như bởi các chỉ thị định tính hoặc định lượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trình tự khởi đầu” nói chung chỉ phân tử ADN có liên quan đến việc nhận dạng và liên kết của ARN polymeraza II và các protein khác (các yếu tố phiên mã hoạt động trans - trans-acting transcription factors) để bắt đầu phiên mã. Trình tự khởi đầu có thể được phân lập từ đầu khởi vùng không dịch mã đầu 5' (5' UTR) của bản sao trong hệ gen của gen. Theo cách khác, trình tự khởi đầu có thể là phân tử ADN được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc thủ công. Trình tự khởi đầu cũng có thể là thể khảm, nghĩa là trình tự khởi đầu được tạo ra bằng cách dung hợp hai hoặc nhiều phân tử ADN khác loại. Trình tự khởi đầu hữu dụng để thực hiện sáng chế bao gồm SEQ ID NO:2. Các phân tử như vậy và biến thể hoặc dẫn xuất bất kỳ của chúng được mô tả trong bản mô tả được xác định tiếp là có hoạt tính của trình tự khởi đầu, nghĩa là, có khả năng hoạt động như một trình tự khởi đầu trong tế bào chủ, như trong thực vật chuyển gen. Theo các phương án cụ thể khác, đoạn có thể được xác định là thể hiện hoạt tính của trình tự khởi đầu, hoạt tính này có trong phân tử trình tự khởi đầu ban mà từ đó thu được nó, hoặc đoạn có thể bao gồm

“trình tự khởi đầu tối thiểu” mà tạo ra mức độ phiên mã cơ bản và bao gồm trình tự TATA box hoặc trình tự tương đương để nhận biết và liên kết phức hợp ARN polymeraza II để bắt đầu phiên mã.

Bản mô tả cũng bộc lộ đoạn trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả. Các đoạn trình tự khởi đầu có thể có hoạt tính trình tự khởi đầu như được mô tả trên đây, và có thể hữu dụng khi dùng một mình hoặc kết hợp với các trình tự khởi đầu và đoạn trình tự khởi đầu khác, như khi tạo ra các trình tự khởi đầu thể khảm. Các đoạn trình tự khởi đầu có thể chứa ít nhất khoảng 50, 95, 150, 250, 500, 750, hoặc ít nhất khoảng 1000 nucleotit liên kề nhau, hoặc dài hơn, thuộc phân tử polynucleotit có hoạt tính của trình tự khởi đầu.

Các sản phẩm thu được từ trình tự khởi đầu có trình tự SEQ ID NO:3, như các sản phẩm bỏ đoạn bên trong hoặc ở đầu 5', ví dụ, có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để cải thiện hoặc thay đổi sự biểu hiện, bao gồm phương pháp loại bỏ các yếu tố có ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực đến sự biểu hiện; nhân đôi các yếu tố có ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực đến sự biểu hiện; và/hoặc nhân đôi hoặc loại bỏ các yếu tố có ảnh hưởng đặc hiệu mô hoặc tế bào đến sự biểu hiện. Có thể sử dụng các sản phẩm thu được từ trình tự khởi đầu có trình tự SEQ ID NO:2, bao gồm sản phẩm bỏ đoạn ở đầu 3' trong đó trình tự TATA box hoặc trình tự tương đương của nó và trình tự tiếp theo được loại bỏ, ví dụ, để tạo ra yếu tố tăng cường. Các sản phẩm bỏ đoạn khác có thể được tạo ra để loại bỏ yếu tố bất kỳ có ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực; đặc hiệu mô; đặc hiệu tế bào; hoặc đặc hiệu thời gian (như nhịp sinh học hàng ngày) đến sự biểu hiện. Trình tự khởi đầu có trình tự SEQ ID NO:2 và đoạn hoặc trình tự tăng cường thu được từ đó có thể được sử dụng để tạo ra yếu tố điều hòa hoạt động phiên mã thể khảm bao gồm trình tự khởi đầu có trình tự SEQ ID NO:2 và đoạn hoặc trình tự tăng cường thu được từ đó liên kết theo kiểu hoạt động được với các trình tự tăng cường và trình tự khởi đầu khác. Hiệu quả của việc cải biến, nhân đôi hoặc bỏ đoạn được mô tả trong bản mô tả đến các khía cạnh biểu hiện mong muốn của một gen chuyển cụ thể có thể được kiểm tra bằng kinh nghiệm trong các thử nghiệm thực vật ổn định và tạm thời, như các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ thực hiện dưới đây, để hợp lý hóa kết quả, mà có thể thay đổi tùy thuộc vào những thay đổi được tạo ra và mục đích của việc thay đổi phân tử ban đầu.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trình tự dẫn” chỉ phân tử ADN được phân lập từ vùng 5' không dịch mã (5' UTR) của bản sao trong hệ gen của gen và được xác định chung là đoạn nucleotit nằm giữa vị trí khởi đầu phiên mã (transcription start site - TSS) và vị trí khởi đầu trình tự mã hóa protein. Theo cách khác, các trình tự dẫn có thể là các yếu tố ADN được tạo ra theo cách tổng hợp hoặc thủ công. Trình tự dẫn có thể được sử dụng làm yếu tố điều hòa ở đầu 5' để cải biến sự biểu hiện của phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được. Các phân tử trình tự dẫn có thể được sử dụng cùng với trình tự khởi đầu khác loại hoặc với trình tự khởi đầu nguyên bản của nó. Do đó, các phân tử trình tự khởi đầu được mô tả ở đây có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự dẫn nguyên bản của chúng hoặc có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự dẫn khác loại. Trình tự dẫn hữu dụng để thực hiện sáng chế có trình tự SEQ ID NO:4. Theo các phương án cụ thể, các trình tự này có thể được xác định là có khả năng hoạt động dưới dạng trình tự dẫn trong tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, tế bào thực vật chuyển gen. Các trình tự như vậy có thể này được giải mã là có hoạt tính trình tự dẫn.

Trình tự dẫn (5' UTR) có trình tự SEQ ID NO:4 có thể bao gồm các yếu tố điều hòa hoặc có thể có cấu trúc bậc hai mà có thể có ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của gen chuyển. Trình tự dẫn này có thể được sử dụng để tạo ra yếu tố điều hòa thể khảm mà ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc sự dịch mã của gen chuyển. Ngoài ra, trình tự dẫn SEQ ID NO:4 có thể được sử dụng để tạo ra trình tự dẫn thể khảm mà ảnh hưởng sự phiên mã hoặc sự dịch mã của gen chuyển.

Việc đưa gen lạ vào vật chủ thực vật mới không phải lúc nào cũng đạt được mức độ biểu hiện cao của gen đưa vào. Hơn nữa, nếu tính đến các đặc điểm phức tạp, đôi lúc cần phải điều biến nhiều gen với phổ biểu hiện theo không gian hoặc theo thời gian. Các intron về cơ bản có thể tạo ra các cải biến này. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều intron cùng loại trong một thực vật đã cho thấy các nhược điểm. Trong các trường hợp này, cần phải có tập hợp các yếu tố kiểm soát cơ bản để xây dựng các yếu tố ADN tái tổ hợp thích hợp. Số intron đã biết trong lĩnh vực này là có đặc tính hạn chế trong tăng cường biểu hiện, và do đó, cần có các giải pháp thay thế.

Các sản phẩm thu được từ intron bất kỳ có trình tự SEQ ID NO:5, 7, và 9 có thể bao gồm các sản phẩm bỏ đoạn hoặc nhân đoạn chứa yếu tố điều hòa cis. Ngoài ra, các sản phẩm thay thế của trình tự đầu 5' và 3' bao gồm các đoạn kết nối intron/exon có thể

được sử dụng to cải thiện sự biểu hiện hoặc độ đặc hiệu của biểu hiện khi liên kết theo kiểu hoạt động được to với trình tự khởi đầu + trình tự dẫn hoặc trình tự khởi đầu thể khảm + trình tự dẫn và trình tự mã hóa. Các sản phẩm thay thế của các vùng đầu 5' và 3' bao gồm đoạn kết nối intron/exon cũng có thể được tạo ra để giảm khả năng đưa vào sai codon khởi đầu và kết thúc tạo ra trong sản phẩm phiên mã thu được sau khi xử lý và kết nối của ARN thông tin. Các intron có thể được kiểm tra bằng kinh nghiệm như mô tả trong các ví dụ thực hiện để xác định ảnh hưởng của intron đến sự biểu hiện của gen chuyển.

Trình tự khởi đầu hoặc đoạn trình tự khởi đầu có thể được phân tích về sự có mặt của các yếu tố trình tự khởi đầu đã biết, nghĩa là các đặc trưng của trình tự ADN, như TATA-box và các mô tip vị trí liên kết yếu tố phiên mã đã biết. Nhận dạng của các yếu tố trình tự khởi đầu đã biết này có thể được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực sử dụng để thiết kế các biến thể của trình tự khởi đầu có phổ biểu hiện tương tự với trình tự khởi đầu gốc.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trình tự tăng cường” hoặc “yếu tố tăng cường” chỉ yếu tố điều hòa phiên mã hoạt động cis (yếu tố cis), yếu tố này tạo ra một khía cạnh của phổ biểu hiện chung, nhưng thường mình nó là không đủ để điều khiển sự phiên mã của trình tự polynucleotit liên kết theo kiểu hoạt động được. Không như các trình tự khởi đầu, các yếu tố tăng cường không thường bao gồm vị trí khởi đầu phiên mã (TSS), hoặc TATA box hoặc trình tự tương đương. Trình tự khởi đầu trong tự nhiên có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố tăng cường mà ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự polynucleotit liên kết theo kiểu hoạt động được. Yếu tố tăng cường được phân lập cũng có thể được dung hợp với trình tự khởi đầu để tạo ra yếu tố cis trình tự khởi đầu thể khảm, yếu tố này tạo ra một khía cạnh của sự cải biến biểu hiện chung. Trình tự khởi đầu hoặc đoạn trình tự khởi đầu có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố tăng cường mà ảnh hưởng đến sự phiên mã của các gen liên kết theo kiểu hoạt động được. Nhiều yếu tố tăng cường trình tự khởi đầu được cho là liên kết với protein liên kết ADN và/hoặc tác động đến hình học topo của ADN, tạo ra các cấu trúc cục bộ mà cho phép một cách có chọn lọc hoặc hạn chế sự tiếp cận của ARN với khuôn ADN, hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho sự mở có chọn lọc của cấu trúc xoắn kép ở vị trí khởi đầu phiên mã. Yếu tố tăng cường có thể có chức năng liên kết các yếu tố phiên mã mà điều hòa sự phiên mã. Một số yếu tố tăng cường liên kết với nhiều hơn một yếu tố

phiên mã, và các yếu tố phiên mã có thể tương tác với ái lực khác nhau với nhiều hơn một vùng tăng cường. Các yếu tố tăng cường có thể được nhận dạng bằng một số kỹ thuật, bao gồm phân tích sự bỏ đoạn, nghĩa là xóa bỏ một hoặc nhiều nucleotit khỏi đầu 5' hoặc bên trong của trình tự khởi đầu; phân tích protein liên kết ADN bằng phương pháp dấu chân DNase I (DNase I Footprinting), phương pháp can thiệp metyl hóa (methylation interference), thử nghiệm phân tích vị trí di chuyển bằng điện di (electrophoresis mobility-shift assay), phương pháp dấu chân hệ gen in vivo bằng kỹ thuật PCR qua lai ghép (in vivo genomic footprinting by ligation-mediated PCR), và các thử nghiệm thông thường khác; hoặc bằng cách phân tích độ tương đồng trong trình tự ADN bằng các mô tip yếu tố cis đã biết hoặc yếu tố tăng cường dưới dạng trình tự đích hoặc mô tip đích với phương pháp so sánh trình tự ADN thông thường, như BLAST. Cấu trúc vùng tăng cường tốt có thể được nghiên cứu tiếp bằng phép đột biến (hoặc thế) một hoặc nhiều nucleotit hoặc bằng các phương pháp thông thường khác. Yếu tố tăng cường có thể thu được bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng cách phân lập từ các yếu tố điều hòa chứa yếu tố này, và chúng có thể được tổng hợp với các nucleotit liên kế nhau bổ sung chứa các vị trí enzym giới hạn hữu dụng để tạo thuận lợi cho việc thao tác trình tự.

Ở thực vật, việc bao gồm một số intron trong cấu trúc gen dẫn đến sự gia tăng tích lũy mRNA và protein so với ở các cấu trúc không có intron. Ảnh hưởng này được gọi là “sự tăng cường qua trung gian intron” (intron mediated enhancement - IME) của biểu hiện gen (Mascarenhas *et al.*, (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:913-920). Các intron đã biết là kích thích sự biểu hiện ở thực vật đã được nhận dạng trong các gen của cây ngô [ví dụ, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, *Ubi1* (Jeon *et al.*, *Plant Physiol.* 123:1005-1014, 2000; Callis *et al.*, *Genes Dev.* 1:1183-1200, 1987; Vasil *et al.*, *Plant Physiol.* 91:1575-1579, 1989; Christiansen *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 18:675-689, 1992) và trong các gen của cây lúa (ví dụ, *salt*, *tpi*: McElroy *et al.*, *Plant Cell* 2:163-171, 1990; Xu *et al.*, *Plant Physiol.* 106:459-467, 1994). Tương tự, các intron từ gen thực vật hai lá mầm như cây dã yên (ví dụ, *rbcS*), khoai tây (ví dụ, *st-ls1*) và *Arabidopsis thaliana* (ví dụ, *ubq3* và *pat1*) đã được phát hiện là làm tăng tỷ lệ biểu hiện gen (Dean *et al.*, *Plant Cell* 1:201-208, 1989; Leon *et al.*, *Plant Physiol.* 95:968-972, 1991; Norris *et al.*, *Plant Mol Biol* 21:895-906, 1993; Rose và Last, *Plant J.* 11:455-464, 1997). Đã có báo cáo cho thấy các phép bỏ đoạn hoặc đột biến trong vị trí kết nối của intron làm giảm mức biểu hiện

gen, điều đó cho thấy rằng có thể cần kết nối đối với IME (Mascarenhas *et al.*, *Plant Mol Biol.* 15:913-920, 1990; Clancy và Hannah, *Plant Physiol.* 130:918-929, 2002). Tuy nhiên, không cần kết nối đối với IME nhất định ở thực vật hai lá mầm, như được thể hiện bằng các đột biến điểm trong vị trí kết nối của gen *pat1* từ *A. thaliana* (Rose và Beliakoff, *Plant Physiol.* 122:535-542, 2000).

Sự tăng cường biểu hiện gen bởi intron không phải hiện tượng chung vì một số đoạn chèn intron trong catxet biểu hiện tái tổ hợp không làm tăng cường sự biểu hiện (ví dụ, các intron từ gen của thực vật hai lá mầm như gen *rbcS* từ cây đậu Hà Lan, gen *phaseolin* từ cây đậu, và gen *stls-1* từ *Solanum tuberosum*) và các intron từ gen của cây ngô (intron thứ chín của gen *adh1*, và intron thứ nhất của gen *hsp81*) (Chee *et al.*, *Gene* 41:47-57, 1986; Kuhlemeier *et al.*, *Mol Gen Genet* 212:405-411, 1988; Mascarenhas *et al.*, *Plant Mol. Biol.* 15:913-920, 1990; Sinibaldi và Mettler, In WE Cohn, K Moldave, eds, *Progress in Nucleic Acid Research và Molecular Biology*, Vol 42. Academic Press, New York, pp 229-257, 1992; Vancanneyt *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250, 1990). Do đó, không phải mọi intron đều có thể dùng để thao tác mức biểu hiện gen của gen ngoại sinh hoặc nội sinh ở thực vật chuyển gen. Vậy đặc tính hoặc đặc điểm trình tự đặc hiệu nào cần phải có trong trình tự intron để tăng cường tỷ lệ biểu hiện của gen đã biết, điều này chưa được biết rõ trong lĩnh vực, và do đó không thể dự đoán xem liệu một intron thực vật đã cho, nếu dùng khác loại, có gây ra IME hay không.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “thể khảm” chỉ phân tử ADN đơn được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó cả phân tử ADN thứ nhất và thứ hai đều thường không được phát hiện trong cấu hình này, *nghĩa là* dung hợp với nhau. Do đó, phân tử ADN thể khảm là phân tử ADN mới không được phát hiện trong tự nhiên. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “trình tự khởi đầu thể khảm” chỉ trình tự khởi đầu được tạo ra bằng cách xử lý các phân tử ADN. Trình tự khởi đầu thể khảm có thể kết hợp hai hoặc nhiều đoạn ADN, ví dụ thể dung hợp của trình tự khởi đầu với yếu tố tăng cường.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “biến thể” chỉ phân tử ADN thứ hai tương tự về thành phần, nhưng không đồng nhất với, phân tử ADN thứ nhất, và phân tử ADN thứ hai vẫn duy trì được hoạt tính chức năng chung, *nghĩa là* phổ biểu hiện giống hoặc tương tự với phân tử ADN thứ nhất. Biến thể có thể là phiên bản ngắn

hơn hoặc được cắt xén của phân tử ADN thứ nhất và/hoặc phiên bản khác của trình tự phân tử ADN thứ nhất, như phiên bản với các vị trí enzym giới hạn và/hoặc các phép bỏ đoạn bên trong, phép thế, và/hoặc phép chèn vào khác. “Biến thể” cũng có thể gồm yếu tố điều hòa có trình tự nucleotit chứa phân tử thế, phép bỏ đoạn, và/hoặc phép chèn vào một hoặc nhiều nucleotit của trình tự đối chứng, trong đó yếu tố điều hòa thu được từ đó có hoạt phiên mã hoặc dịch mã cao hơn hoặc thấp hơn hoặc bằng so với phân tử điều hòa gốc tương ứng. Các “biến thể” yếu tố điều hòa cũng bao gồm các biến thể phát sinh từ đột biến xảy ra trong tự nhiên ở thể biến nạp tế bào vi khuẩn và thực vật. Theo sáng chế, trình tự polynucleotit có SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 6, và 8 có thể được sử dụng để tạo ra các biến thể tương tự về thành phần, nhưng không đồng nhất, với trình tự polynucleotit của yếu tố điều hòa ban đầu, trong khi vẫn duy trì được hoạt tính chức năng chung, *nghĩa là* phổ biểu hiện giống hoặc tương tự với yếu tố điều hòa ban đầu. Việc sản xuất các biến thể như vậy theo sáng chế thuộc về các kỹ năng thông thường trong lĩnh vực theo bản mô tả. Các “biến thể” yếu tố điều hòa thể khả chứa các yếu tố cấu thành giống với trình tự đối chứng, nhưng các yếu tố cấu thành bao gồm yếu tố điều hòa thể khả có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như cắt và nối bằng enzym giới hạn, tách dòng không nối, ráp nối có điều chỉnh các sản phẩm PCR khi khuếch đại, hoặc tổng hợp hóa học trực tiếp yếu tố điều hòa, cũng các phương pháp đã biết khác trong lĩnh vực này. “Biến thể” yếu tố điều hòa thể khả thu được có thể bao gồm cùng loại, hoặc biến thể của cùng loại, yếu tố cấu thành của trình tự đối chứng nhưng khác về trình tự hoặc các trình tự bao gồm trình tự liên kết hoặc các trình tự để liên kết theo kiểu hoạt động được các phần cấu thành với nhau. Theo sáng chế, trình tự polynucleotit có SEQ ID NO: 1, 3, 6, và 8 là trình tự đối chứng trong đó các yếu tố cấu thành bao gồm trình tự đối chứng này có thể được nối với nhau bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực và có thể bao gồm các phép thế, phép bỏ đoạn, và/hoặc phép chèn vào một hoặc nhiều nucleotit hoặc thể đột biến có trong tự nhiên khi biến nạp tế bào vi khuẩn và thực vật.

Cấu trúc

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cấu trúc” chỉ phân tử polynucleotit tái tổ hợp bất kỳ như plasmit, cosmit, virut, phân tử polynucleotit sao chép độc lập, thể thực khuẩn, hoặc phân tử polynucleotit ADN hoặc ARN thẳng hoặc vòng, sợi đơn hoặc sợi kép, thu được từ

nguồn bất kỳ, có khả năng tích hợp vào hệ gen hoặc sao chép độc lập, chứa phân tử polynucleotit, trong đó một hoặc nhiều phân tử polynucleotit được liên kết theo cách hoạt động chức năng, tức là được liên kết theo cách hoạt động được. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” nghĩa là cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp bất kỳ mà có thể được sử dụng nhằm mục đích biến nạp, tức là đưa ADN khác loại vào tế bào chủ. Vector có thể bao gồm catxet biểu hiện hoặc catxet chuyển gen được tách khỏi phân tử bất kỳ nêu trên. Các catxet biểu hiện hoặc catxet chuyển gen hữu dụng bao gồm các nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã (“EXP”) có trình tự SEQ ID NO:1, 6, hoặc 8 được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại, mà được liên kết theo kiểu hoạt động được với các 3' UTR có trình tự SEQ ID NO:10, 11, 12, hoặc 13.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “liên kết theo kiểu hoạt động được” chỉ phân tử thứ nhất liên kết với phân tử thứ hai, trong đó các phân tử này được sắp xếp sao cho phân tử thứ nhất tác động đến chức năng của phân tử thứ hai. Hai phân tử có thể là các phần của một phân tử liên kết duy nhất hoặc không và có thể nằm sát nhau hoặc không. Ví dụ, trình tự khởi đầu được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được nếu trình tự khởi đầu điều biến sự phiên mã của phân tử polynucleotit phiên mã được cần quan tâm trong tế bào. Trình tự dẫn, ví dụ, được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa khi nó có khả năng làm trình tự dẫn cho polypeptit được mã hóa bởi trình tự mã hóa này.

Các cấu trúc được mô tả ở đây bao gồm các cấu trúc ADN viên Ti plasmit kép mà có các vùng bờ phải (RB hoặc AGRtu.RB) và viên trái (LB hoặc AGRtu.LB) của Ti plasmit phân lập từ *Agrobacterium tumefaciens* chứa T-ADN, cùng với ác phân tử vận chuyển từ các tế bào *A. tumefaciens* cho phép tự kết hợp của T-ADN vào hệ gen của tế bào thực vật (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,603,061). Các cấu trúc cũng có thể chứa các đoạn ADN khung plasmit tạo ra chức năng sao chép và chọn lọc bằng kháng sinh trong các tế bào vi khuẩn, ví dụ, nguồn sao chép *Escherichia coli* như *ori322*, nguồn sao chép có phạm vi vật chủ rộng như *oriV* hoặc *oriRi*, và vùng mã hóa dấu chuẩn chọn lọc như Spec/Strp mà mã hóa Tn7 aminoglycosit adenylyltransferaza (*aadA*) tạo ra tính kháng spectinomycin hoặc streptomycin, hoặc gen dấu chuẩn chọn lọc gentamixin (Gm, Gent). Để biến nạp thực vật, chủng vi khuẩn chủ thường là *A. tumefaciens* ABI, C58, hoặc LBA4404; tuy nhiên, các chủng khác đã biết trong lĩnh vực này để biến nạp thực vật cũng có thể có chức năng này.

Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để ráp nối và đưa các cấu trúc vào tế bào theo cách sao cho phân tử polynucleotit phiên mã được được phiên mã thành phân tử mARN chức năng mà được dịch mã và biểu hiện thành sản phẩm protein. Để thực hiện sáng chế, các chế phẩm và phương pháp để chuẩn bị và sử dụng các cấu trúc và tế bào chủ đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực biết rõ (xem, ví dụ, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition Volumes 1, 2, and 3, J. Sambrook, D.W. Russell, và N. Irwin, Lạnh Spring Harbor Laboratory Press, 2000). Các phương pháp tạo ra vector tái tổ hợp đặc biệt thích hợp để biến nạp thực vật bao gồm các vector được mô tả trong Patent Mỹ số 4,971,908; 4,940,835; 4,769,061; và 4,757,011. Các loại vector cũng đã được đánh giá trong tài liệu khoa học (xem, ví dụ, Rodriguez, *et al.*, *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston, 1988; và Glick *et al.*, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL., 1993). Các vector thông thường hữu dụng để biểu hiện các axit nucleic ở thực vật bậc cao đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các vector thu được từ plasmit cảm ứng khối u (tumor-inducing - Ti) của *A. tumefaciens* (Rogers *et al.*, *Methods in Enzymology* 153: 253-277, 1987). Các vector tái tổ hợp khác hữu dụng để biến nạp thực vật bao gồm vector kiểm soát việc chuyển gen pCaMVCN, cũng đã được mô tả trong tài liệu khoa học (xem, ví dụ, Fromm *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828, 1985).

Các yếu tố điều hòa khác nhau có thể có trong cùng cấu trúc bao gồm các yếu tố bất kỳ trong số các yếu tố được đề xuất trong bản mô tả. Yếu tố điều hòa bất kỳ có thể được tạo ra kết hợp với yếu tố điều hòa khác bất kỳ. Các tổ hợp như vậy có thể được thiết kế hoặc cải biến để tạo ra các đặc tính điều hòa mong muốn. Các cấu trúc được mô tả ở đây bao gồm ít nhất một yếu tố điều hòa liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được mà liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử kết thúc sự phiên mã ở đầu 3'.

Các cấu trúc này có thể bao gồm trình tự khởi đầu hoặc trình tự dẫn bất kỳ được đề xuất trong bản mô tả hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, trình tự khởi đầu có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự dẫn đầu 5' không dịch mã khác loại như trình tự thu được từ gen protein sốc nhiệt (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,659,122 và 5,362,865). Theo cách khác, trình tự dẫn có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được

với trình tự khởi đầu khác loại như trình tự khởi đầu phiên mã của virus khảm súp lơ (Cauliflower Mosaic Virus - CaMV) 35S (*xem*, Patent Mỹ số 5,352,605).

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “intron” chỉ phân tử ADN có thể phân lập hoặc nhận dạng từ bản sao hệ gen của gen và có thể xác định chung là vùng bị loại bỏ khi xử lý mRNA trước khi dịch mã. Theo cách khác, intron có thể là yếu tố ADN được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc thủ công. Intron có thể chứa các yếu tố tăng cường ảnh hưởng đến sự phiên mã của gen liên kết theo kiểu hoạt động được. Intron có thể được sử dụng làm yếu tố điều hòa để điều biến sự biểu hiện phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được. Cấu trúc ADN có thể bao gồm intron, và intron có thể là khác loại hoặc không so với trình tự phân tử polynucleotit phiên mã được. Ví dụ về các intron trong lĩnh vực này bao gồm intron actin của cây lúa (Patent Mỹ số 5,641,876) và intron HSP70 của cây ngô (Patent Mỹ số 5,859,347). Các intron hữu dụng để thực hiện sáng chế bao gồm SEQ ID NO: 5, 7, và 9. Hơn nữa, khi cải biến các trình tự ranh giới intron/exon, có thể tốt hơn nếu không sử dụng trình tự nucleotit AT hoặc nucleotit A ngay trước đầu 5' của vị trí ghép nối (GT) và lần lượt nucleotit G hoặc trình tự nucleotit TG ngay sau đầu 3' vị trí ghép nối (AG) để loại trừ khả năng tạo ra các codon mở đầu không mong muốn trong khi xử lý ARN thông tin thành sản phẩm phiên mã cuối. Do đó, trình tự quanh các vị trí kết nối đầu 5' hoặc 3' của intron có thể được cải biến theo cách này.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “phân tử kết thúc sự phiên mã đầu 3'” hoặc “3' UTR” chỉ phân tử ADN được dùng trong quá trình phiên mã để tạo ra vùng không dịch mã đầu 3' (3' UTR) của phân tử mRNA. Vùng không dịch mã đầu 3' phân tử mRNA có thể được tạo ra bằng phương pháp phân cắt đặc hiệu và polyadenyl hóa đầu 3' (đuôi polyA). 3' UTR có thể được liên kết theo kiểu hoạt động được với và định vị phía dưới phân tử polynucleotit phiên mã được và có thể bao gồm các polynucleotit mà tạo ra tín hiệu polyadenyl hóa và các tín hiệu điều hòa khác có khả năng tác động đến sự phiên mã, xử lý mRNA, hoặc biểu hiện gen. Đuôi polyA được cho là có hoạt tính chức năng trong sự ổn định mRNA và trong sự khởi đầu dịch mã. Ví dụ về các phân tử kết thúc sự phiên mã 3' trong lĩnh vực này là vùng nopalin synthaza 3' (*xem*, Fraley, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4803-4807, 1983); vùng hsp17 3' của lúa mỳ; vùng tiểu đơn vị rubisco 3' của đậu Hà Lan; vùng E6 3' của

cây bông (Patent Mỹ số 6,096,950); các vùng 3' được bộc lộ trong WO/0011200 A2; và coixin 3' UTR (Patent Mỹ số 6,635,806).

Các 3' UTR thường có lợi cho việc biểu hiện tái tổ hợp các gen cụ thể. Trong hệ động vật, cơ chế hoạt động của các 3' UTR đã được xác định rõ (ví dụ, Zhao *et al.*, *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405–445, 1999; Proudfoot, *Nature* 322:562–565, 1986; Kim *et al.*, *Biotechnology Progress* 19:1620–1622, 2003; Yonaha và Proudfoot, *EMBO J.* 19:3770–3777, 2000; Cramer *et al.*, *FEBS Letters* 498:179–182, 2001; Kuerstem và Goodwin, *Nature Reviews Genetics* 4:626–637, 2003). Cần phải kết thúc hiệu quả sự phiên mã ARN để ngăn ngừa sự phiên mã không mong muốn của các trình tự không liên quan về đặc điểm (phía dưới), mà có thể cản trở việc thể hiện các đặc điểm. Sự sắp xếp các catxet biểu hiện gen trong vùng lân cận với nhau (ví dụ, trong một T-ADN) có thể gây ra sự kìm hãm biểu hiện gen của một hoặc nhiều gen trong cấu trúc đó so với các đoạn chèn độc lập (Padidam và Cao, *BioTechniques* 31:328–334, 2001). Điều này có thể cản trở việc thu được các mức biểu hiện đầy đủ, chẳng hạn trong trường hợp mà sự biểu hiện gen mạnh là cần thiết trong tất cả các catxet.

Ở thực vật, các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa là chưa được xác định rõ. Hasegawa và các đồng tác giả (*Plant J.* 33:1063–1072, 2003) không thể nhận dạng các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa bảo tồn trong cả hai hệ *in vitro* và *in vivo* ở *Nicotiana sylvestris* và xác định độ dài thực của sản phẩm phiên mã đầu tiên (không polyadenyl hóa). Một 3' UTR yếu có thể gây ra hiện tượng đọc xuyên (read-through), mà có thể tác động đến sự biểu hiện của các gen nằm trong các catxet biểu hiện lân cận (Padidam và Cao, *BioTechniques* 31:328–334, 2001). Sự kiểm soát kết thúc phiên mã thích hợp có thể ngăn ngừa hiện tượng đọc xuyên vào trình tự (ví dụ, các catxet biểu hiện khác) nằm phía dưới và có thể tiếp tục cho phép tái sử dụng hiệu quả ARN polymeraza, để cải thiện sự biểu hiện gen. Sự kết thúc hiệu quả phiên mã (giải phóng ARN Polymeraza II khỏi ADN) là điều kiện tiên quyết để khởi đầu lại sự phiên mã và nhờ đó tác động trực tiếp đến mức phiên mã chung. Sau khi kết thúc phiên mã, mARN trưởng thành được giải phóng khỏi vị trí tổng hợp và vận chuyển đến tế bào chất. Các mARN của sinh vật có nhân điển hình được tích tụ dưới dạng poly(A) *in vivo*, điều này làm cho khó phát hiện các vị trí kết thúc phiên mã bằng phương pháp thông thường. Tuy nhiên, khó dự đoán các 3' UTR chức năng và hiệu quả bằng các phương pháp tin sinh ở chỗ không có trình tự bảo tồn để dễ dự đoán 3' UTR hữu hiệu.

Trên quan điểm thực tiễn, có thể có lợi nếu 3' UTR dùng trong catxet chuyển gen có các đặc tính nhất định. Ví dụ, 3' UTR hữu dụng theo sáng chế có thể kết thúc sự phiên mã của gen chuyển một cách hữu hiệu và hiệu quả và ngăn sự đọc xuyên của sản phẩm phiên mã thành trình tự ADN lân cận bất kỳ, mà có thể bao gồm catxet chuyển gen khác, như trong trường hợp nhiều catxet nằm trong cùng một T-ADN, hoặc ADN của nhiễm sắc thể lân cận mà T-ADN được chèn vào. 3' UTR tốt nhất không được gây ra sự giảm hoạt tính phiên mã của trình tự khởi đầu, trình tự dẫn, và các intron được dùng để điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển. Trong công nghệ sinh học thực vật, 3' UTR thường dùng để khơi mào phản ứng khuếch đại của ARN phiên mã ngược chiết từ thực vật được biến nạp và có thể được sử dụng để (1) đánh giá hoạt tính phiên mã hoặc biểu hiện của catxet chuyển gen khi được kết hợp vào nhiễm sắc thể thực vật; (2) đánh giá số bản sao của các đoạn chèn trong ADN thực vật; và (3) đánh giá độ tương đồng về alen (zygosity) của hạt thu được sau khi nhân giống. 3' UTR cũng có thể được dùng trong các phản ứng khuếch đại ADN chiết từ thực vật được biến nạp để xác định đặc tính nguyên vẹn của catxet được chèn vào.

Các 3' UTR hữu dụng đối với sự biểu gen chuyển ở thực vật có thể được nhận dạng dựa trên sự biểu hiện của các đuôi trong trình tự được biểu hiện (expressed sequence tag - EST) trong thư viện ADN bổ trợ tạo ra từ ARN thông tin phân lập từ hạt, hoa, hoặc mô khác bất kỳ thu được từ, ví dụ, cỏ cuống xanh (*Andropogon gerardii*), cỏ chùm [*Saccharum ravennae* (*Erianthus ravennae*)], cỏ sâu róm (*Setaria viridis*), cỏ ngô (họ Ngô loài phụ *mexicana*), kê đuôi cáo (*Setaria italica*), hoặc bo bo (*Coix lacryma-jobi*). Bằng cách sử dụng các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã biết, có thể tạo ra thư viện ADN bổ trợ từ mô phân lập từ các loài thực vật bằng mô hoa, hạt, lá, rễ, hoặc các mô thực vật khác. Các ADN bổ trợ (cDNA) thu được được xác định trình tự bằng nhiều phương pháp xác định trình tự đã biết trong lĩnh vực. Các EST thu được được lắp ráp thành cụm bằng phần mềm tin sinh như `clc_ref_assemble_complete` phiên bản 2.01.37139 (CLC bio USA, Cambridge, Massachusetts 02142). Lượng sản phẩm phiên mã của mỗi cụm được xác định bằng cách đếm số lần đọc ADN bổ trợ trong mỗi cụm. Các 3' UTR được nhận dạng có thể bao gồm trình tự thu được từ trình tự ADN bổ trợ, cũng như trình tự thu được từ ADN hệ gen. Trình tự ADN bổ trợ có thể được sử dụng để thiết kế các đoạn mồi, mà sau đó có thể được sử dụng với thư viện GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc,

Mountain View, CA) xây dựng theo quy trình của nhà sản xuất để tách dòng vùng 3' của trình tự ADN hệ gen tương ứng để tạo ra trình tự kết thúc dài hơn. Phép phân tích lượng sản phẩm phiên mã tương ứng bằng cách đếm trực tiếp hoặc đếm đơn giản hóa số lần đọc trình tự quan sát được đối với mỗi thư viện mô có thể được sử dụng để tạo ra các đặc tính về phổ biểu hiện. Ví dụ, một số 3' UTR có thể được phát hiện trong sản phẩm phiên mã ở mô rễ nhiều hơn so với ở mô lá. Điều này cho thấy rằng sản phẩm phiên mã được biểu hiện nhiều ở rễ và đặc tính biểu hiện ở rễ có thể do sự điều hòa phiên mã của trình tự khởi đầu, trình tự dẫn, intron hoặc 3' UTR. Thử nghiệm trên các 3' UTR được nhận dạng bằng đặc tính biểu hiện trong các cơ quan, mô hoặc loại tế bào cụ thể có thể nhận dạng các 3' UTR mà tăng cường sự biểu hiện trong các cơ quan, mô hoặc loại tế bào cụ thể đó. Các 3' UTR hữu dụng trong thực hiện sáng chế có SEQ ID NO: 10, 11, 12 và 13.

Các cấu trúc và vector cũng có thể bao gồm trình tự mã hóa peptit vận chuyển mà biểu hiện peptit liên kết hữu dụng để hướng sản phẩm protein, cụ thể là đến lục lạp, vô sắc lạp, hoặc cơ quan tử thể hạt khác; thể hạt sợi; thể peroxi; không bào; hoặc vùng ngoại bào. Việc sử dụng các peptit vận chuyển lục lạp được mô tả trong Patent Mỹ số 5,188,642 và 5,728,925. Nhiều protein khu trú trong lục lạp được biểu hiện từ các gen nhân dưới dạng tiền chất và được hướng đến lục lạp bởi peptit vận chuyển lục lạp (chloroplast transit peptide - CTP). Ví dụ về các protein lục lạp này bao gồm các protein có liên quan đến các tiểu đơn vị (small subunit - SSU) của ribuloza-1,5,-bisphosphat carboxylaza, ferredoxin, ferredoxin oxidoreductase, phức hợp thu sáng protein I và protein II, thioredoxin F, enolpyruvyl shikimat phosphat synthase (EPSPS), và các peptit vận chuyển được mô tả trong Patent Mỹ số 7,193,133. Đã chứng tỏ *in vivo* và *in vitro* rằng protein không thuộc lục lạp có thể được hướng đến lục lạp bằng thể dung hợp protein với CTP khác loại và CTP là đủ để hướng protein đến lục lạp. Việc kết hợp peptit vận chuyển lục lạp thích hợp như *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (xem, Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) hoặc *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (xem, della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877, 1986) đã thể hiện là hướng đích các trình tự protein EPSPS khác loại đến lục lạp ở thực vật chuyển gen (xem, Patent Mỹ số 5,627,061; 5,633,435; và 5,312,910; và EP 0218571; EP 189707; EP 508909; và EP 924299).

Phân tử polynucleotit phiên mã được

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “phân tử polynucleotit phiên mã được” chỉ phân tử ADN có khả năng được phiên mã thành phân tử ARN, bao gồm các phân tử ADN có trình tự mã hóa protein và tạo ra phân tử ARN có trình tự hữu dụng để ức chế gen. “Gen chuyển” chỉ phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại so với tế bào chủ ít nhất ở vị trí của nó trong hệ gen và/hoặc phân tử polynucleotit phiên mã được được kết hợp theo cách nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ trong cùng thể hệ hoặc trong thể hệ tế bào trước bất kỳ.

Trình tự khởi đầu chứa trong phân tử ADN theo sáng chế được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được khác loại so với phân tử trình tự khởi đầu. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “khác loại” chỉ tổ hợp của hai hoặc nhiều phân tử polynucleotit trong đó tổ hợp này thường không được phát hiện trong tự nhiên. Ví dụ, hai phân tử có thể có nguồn gốc từ các loài khác nhau và/hoặc hai phân tử có thể có nguồn gốc từ các gen khác nhau, *ví dụ*, các gen khác nhau của cùng một loài, hoặc các gen giống nhau của các loài khác nhau. Do đó, trình tự khởi đầu là khác loại so với phân tử polynucleotit phiên mã được liên kết theo kiểu hoạt động được nếu tổ hợp này thường không phát hiện được trong tự nhiên, *nghĩa là* phân tử polynucleotit phiên mã được không tự nhiên liên kết theo kiểu hoạt động được trong tổ hợp với phân tử trình tự khởi đầu.

Phân tử polynucleotit phiên mã được thường có thể là phân tử ADN bất kỳ mà mong muốn biểu hiện được sản phẩm phiên mã ARN đối với nó. Sự biểu hiện sản phẩm phiên mã ARN có thể dẫn đến sự dịch mã của phân tử mRNA thu được và do đó, sự biểu hiện protein. Theo cách khác, ví dụ, phân tử polynucleotit phiên mã được có thể được thiết kế để về cơ bản làm giảm mức biểu hiện gen hoặc protein cụ thể. Điều này có thể thực hiện được bằng cách sử dụng phân tử polynucleotit phiên mã được được định hướng theo hướng mạch đối nghĩa. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này đã quen với việc sử dụng công nghệ mạch đối nghĩa đó. Tóm lại, do phân tử polynucleotit phiên mã được đối nghĩa được phiên mã, sản phẩm ARN lai với và cô lập phân tử ARN trong tế bào. Phân tử ARN kép này không thể được dịch mã thành protein theo cơ chế dịch mã của tế bào và bị thoái hóa trong tế bào. Gen bất kỳ có thể bị điều chỉnh theo hướng bất lợi theo cơ chế này.

Do đó, phân tử ADN có trình tự SEQ ID NO: 1, 3, 6, và 8, được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được để điều biến sự phiên mã của phân tử polynucleotit phiên mã được ở mức mong muốn hoặc theo phổ mong muốn khi cấu trúc này được kết hợp vào hệ gen của tế bào thực vật. Phân tử polynucleotit phiên mã được bao gồm vùng mã hóa protein của gen, và trình tự khởi đầu tác động đến sự phiên mã của phân tử ARN mà được dịch mã và biểu hiện thành sản phẩm protein. Theo cách khác, phân tử polynucleotit phiên mã được có thể chứa vùng đối nghĩa của gen, và trình tự khởi đầu tác động đến sự phiên mã của phân tử ARN đối nghĩa, ARN mạch kép hoặc phân tử ARN ức chế tương tự để ức chế sự biểu hiện phân tử ARN cụ thể cần quan tâm trong tế bào chủ đích.

Các gen được quan tâm trong nông học

Phân tử polynucleotit phiên mã được chứa phân tử ADN theo sáng chế có thể là các gen được quan tâm trong nông học. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “gen được quan tâm trong nông học” chỉ phân tử polynucleotit phiên mã được mà, khi được biểu hiện ở mô, tế bào, hoặc loại tế bào thực vật cụ thể, tạo ra đặc tính mong muốn, như các đặc tính có liên quan đến hình thái, sinh lý, sự sinh trưởng, phát triển, năng suất, sản phẩm, đặc điểm dinh dưỡng, khả năng kháng bệnh hoặc sâu bệnh của thực vật cụ thể, và/hoặc khả năng chống chịu môi trường hoặc hóa học của thực vật. Các gen được quan tâm trong nông học bao gồm các gen mã hóa protein hoa lợi, protein kháng điều kiện bất lợi, protein kiểm soát sự phát triển, protein biệt hóa mô, protein mô phân sinh, protein đáp ứng với môi trường, protein lão hóa, protein đáp ứng hormon, protein cắt (abscission protein), protein nguồn, protein sợi, protein kiểm soát sự hình thành hoa, protein hạt, protein kháng thuốc diệt cỏ, protein kháng bệnh, enzym sinh tổng hợp axit béo, enzym sinh tổng hợp tocopherol, enzym sinh tổng hợp axit amin, protein trừ sâu, hoặc các tác nhân khác, như phân tử đối nghĩa hoặc phân tử ARNi hướng đến gen cụ thể để kìm hãm. Sản phẩm của gen được quan tâm trong nông học có thể hoạt động trong thực vật để gây ra ảnh hưởng đến sinh lý hoặc trao đổi chất của thực vật, hoặc có thể hoạt động dưới dạng tác nhân trừ sâu đối với các sâu bệnh ăn thực vật.

Theo một phương án theo sáng chế, trình tự khởi đầu được kết hợp vào cấu trúc sao cho trình tự khởi đầu này được liên kết theo kiểu hoạt động được với phân tử polynucleotit phiên mã được mà là gen được quan tâm trong nông học. Sự biểu hiện

gen được quan tâm trong nông học là mong muốn để tạo ra tính trạng có lợi về mặt nông học. Tính trạng có lợi về mặt nông học có thể bao gồm ví dụ, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, kiểm soát côn trùng, năng suất cải thiện, kháng bệnh do nấm, kháng virus, kháng giun tròn, kháng bệnh do vi khuẩn, sinh trưởng và phát triển thực vật, khả năng sản xuất tinh bột, khả năng sản xuất dầu cải thiện, khả năng sản xuất dầu cao, hàm lượng axit béo cải thiện, khả năng sản xuất protein cao, khả năng làm chín quả, dinh dưỡng động vật và người cải thiện, các polyme sinh học, khả năng chịu được điều kiện bất lợi từ môi trường, các peptit có hoạt tính được và các peptit tiết ra được, các đặc điểm chế biến cải thiện, khả năng tiêu hóa cải thiện, khả năng sản xuất enzyme, hương vị, khả năng cố định nitơ, khả năng sản xuất hạt lai, khả năng sản xuất sợi, và khả năng sản xuất nhiên liệu sinh học, và các đặc điểm khác. Ví dụ về các gen được quan tâm trong nông học đã biết trong lĩnh vực này bao gồm các gen chống chịu được thuốc diệt cỏ (Patent Mỹ số 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; và 5,463,175), tăng năng suất (Patent Mỹ số USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; và 5,716,837), phòng trừ sâu bệnh (Patent Mỹ số 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658; 5,880,275; 5,763,245; và 5,763,241), kháng bệnh từ nấm (Patent Mỹ số 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; và 6,506,962), kháng virus (Patent Mỹ số 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; và 5,304,730), kháng giun tròn (Patent Mỹ số 6,228,992), kháng bệnh do vi khuẩn (Patent Mỹ số 5,516,671), sinh trưởng và phát triển thực vật (Patent Mỹ số 6,723,897 và 6,518,488), sản xuất tinh bột (Patent Mỹ số 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; và 6,476,295), khả năng sản xuất dầu cải thiện (Patent Mỹ số 6,444,876; 6,426,447; và 6,380,462), khả năng sản xuất dầu cao (Patent Mỹ số 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; và 6,476,295), làm lượng axit béo cải thiện (Patent Mỹ số 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; và 6,459,018), khả năng sản xuất protein cao (Patent Mỹ số

6,380,466), khả năng làm chín quả (Patent Mỹ số 5,512,466), dinh dưỡng động vật và người tăng (Patent Mỹ số 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; và 6,171,640), polyme sinh học (Patent Mỹ số USRE37,543; 6,228,623; 5,958,745; và 6,946,588), chịu được điều kiện bất lợi của môi trường (Patent Mỹ số 6,072,103), peptit có hoạt tính được học và peptit tiết ra được (Patent Mỹ số 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; và 6,080,560), các đặc điểm chế biến cải thiện (Patent Mỹ số 6,476,295), khả năng tiêu hóa cải thiện (Patent Mỹ số 6,531,648) hàm lượng rafinoza thấp (Patent Mỹ số 6,166,292), sản xuất enzym công nghiệp (Patent Mỹ số 5,543,576), hương vị cải thiện (Patent Mỹ số 6,011,199), cố định nitơ (Patent Mỹ số 5,229,114), sản xuất hạt lai (Patent Mỹ số 5,689,041), sản xuất sợi (Patent Mỹ số 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; và 5,869,720) và sản xuất nhiều liệu sinh học (Patent Mỹ số 5,998,700).

Theo cách khác, gen được quan tâm trong nông học có thể tác động đến các đặc tính hoặc kiểu hình trên đây của thực vật bằng cách mã hóa phân tử ARN gây ra các cải biến đích trong biểu hiện gen của gen nội sinh, ví dụ thông qua trình tự đối nghĩa (xem ví dụ, Patent Mỹ số 5,107,065); ARN ức chế ("ARNi," bao gồm việc cải biến biểu hiện gen qua cơ chế trung gian bởi tiểu ARN (miRNA), ARN ngăn can thiệp (Small interfering RNA - siRNA), tiểu ARN can thiệp điều hòa trans (trans-acting siRNA), và ARN ngăn theo giai đoạn (phased sRNA), ví dụ, như được mô tả trong các đơn sáng chế US 2006/0200878 và US 2008/0066206, và US 2009/0070898); hoặc cơ chế đồng ức chế (cosuppression-mediated mechanisms). ARN cũng có thể là phân tử ARN xúc tác (ví dụ, ribozym hoặc riboswitch; xem ví dụ, US 2006/0200878) được thao tác di truyền để phân cắt sản phẩm mARN nội sinh mong muốn. Do đó, phân tử polynucleotit phiên mã được bất kỳ mã hóa phân tử ARN được phiên mã mà có tác động đến sự thay đổi kiểu hình hoặc hình thái được quan tâm trong nông học đang quan tâm có thể hữu dụng để thực hiện sáng chế. Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để xây dựng và đưa các cấu trúc vào tế bào theo cách sao cho phân tử polynucleotit phiên mã được được phiên mã thành phân tử có khả năng gây ra sự kìm hãm gen. Ví dụ, sự kìm hãm gen sau khi phiên mã bằng cách sử dụng cấu trúc với phân tử polynucleotit phiên mã được định hướng đối nghĩa để điều hòa sự biểu hiện gen trong tế bào thực vật được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,107,065 và 5,759,829, và sự kìm hãm gen sau khi phiên mã bằng cách sử dụng cấu trúc với phân tử polynucleotit phiên mã được được định hướng có nghĩa để điều hòa sự biểu hiện gen ở

thực vật được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,283,184 và 5,231,020. Sự biểu hiện polynucleotit phiên mã được trong tế bào thực vật cũng có thể được dùng để tìm hãm sâu bệnh ở thực vật mà ăn tế bào thực vật, ví dụ, các thành phần phân lập được từ sâu bệnh cánh cứng (Cổng bố đơn Mỹ số US20070124836) và các thành phần phân lập được từ sâu bệnh loại họ giun tròn (Cổng bố đơn Mỹ số US20070250947). Sâu bệnh ở thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sâu bệnh họ chân đốt, sâu bệnh họ giun tròn, và nấm hoặc vi khuẩn. Phân tử polynucleotit phiên mã được làm ví dụ để kết hợp vào các cấu trúc theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các phân tử ADN hoặc gen từ các loài không phải loài hoặc gen đích mà có nguồn gốc hoặc có trong cùng loài, mà được kết hợp vào tế bào nhận bằng các phương pháp thao tác di truyền chứ không phải bằng các kỹ thuật sinh sản hoặc gây giống cổ điển. Loại phân tử polynucleotit có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử polynucleotit mà đã có trong tế bào thực vật, phân tử polynucleotit từ thực vật khác, phân tử polynucleotit từ sinh vật khác, hoặc phân tử polynucleotit ngoại sinh, như phân tử polynucleotit chứa thông tin đối nghĩa của gen, hoặc phân tử polynucleotit mã hóa phiên bản nhân tạo, tổng hợp, hoặc cải biến khác của gen chuyển.

Dấu chuẩn chọn lọc

Như được sử dụng trong bản mô tả thuật ngữ “dấu chuẩn” chỉ phân tử polynucleotit phiên mã được mà sự biểu hiện của nó, hoặc thiếu nó, có thể được sàng lọc hoặc tính điểm theo một số phương pháp. Các gen dấu chuẩn để dùng trong theo sáng chế bao gồm phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa β -glucuronidaza (GUS, được mô tả trong Patent Mỹ số 5,599,670), protein huỳnh quang xanh lục và các biến thể của nó (Green Fluorescent Protein - GFP, được mô tả trong Patent Mỹ số 5,491,084 và 6,146,826), các protein mà tạo ra khả năng kháng kháng sinh, hoặc protein tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ. Các dấu chuẩn kháng kháng sinh hữu dụng bao gồm các dấu chuẩn mã hóa protein tạo ra khả năng kháng kanamycin (*nptII*), hygromycin B (*aph IV*), streptomycin hoặc spectinomycin (*aad*, *spec/strep*) và gentamycin (*aac3* và *aacC4*), đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các thuốc diệt cỏ mà thực vật chuyển gen đã chứng tỏ là chống chịu được có thể bao gồm: các thuốc diệt cỏ axit amino-metyl-phosphonic, glyphosat, glufosinat, sulfonylure, imidazolinon, bromoxynil, dalapon, dicamba, xyclohexanedion, các chất ức chế protoporphyrinogen oxidaza, và isoxasflutol. Phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa protein có khả

năng chống chịu thuốc diệt cỏ là đã biết trong lĩnh vực này, và có thể bao gồm phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS để chống chịu glyphosat, được mô tả trong Patent Mỹ số 5,627,061; 5,633,435; 6,040,497; và 5,094,945); phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa glyphosat oxidoreductaza và glyphosat-N-axetyl transferaza (GOX, được mô tả trong Patent Mỹ số 5,463,175; GAT, được mô tả trong đơn Mỹ số 20030083480; và dicamba monooxygenaza, được mô tả trong đơn Mỹ số 20030135879); phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa bromoxynil nitrilaza (*Bxn* để chống chịu Bromoxynil, được mô tả trong Patent Mỹ số 4,810,648); phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa phytoen desaturaza (*crtI*) được mô tả trong Misawa, *et al.* (*Plant Journal* 4:833-840, 1993; và *Plant Journal* 6:481-489, 1994) để chống chịu norflurazon; phân tử polynucleotit phiên mã được mã hóa axetohydroxyaxit synthaza (AHAS, *aka* ALS) được mô tả trong Sathasiivan, *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 18:2188-2193, 1990) để chống chịu các thuốc diệt cỏ sulfonylure; và gen *bar* được mô tả trong DeBlock, *et al.* (*EMBO Journal* 6:2513-2519, 1987) để chống chịu glufosinat và bialaphos. Các phân tử trình tự khởi đầu chứa trong phân tử ADN theo sáng chế có thể biểu hiện phân tử polynucleotit phiên mã được được liên kết mà mã hóa phosphinothrixin axetyltransferaza, EPSPS kháng glyphosat, aminoglycosid phosphotransferaza, hydroxyphenyl pyruvat dehydrogenaza, hygromyxin phosphotransferaza, neomycin phosphotransferaza, dalapon dehalogenaza, nitrilaza kháng bromoxynil, antranilat synthaza, aryloxyalkanoat dioxygenaza, axetyl CoA carboxylaza, glyphosat oxidoreductaza, và glyphosat-N-axetyl transferaza.

Thuật ngữ “dấu chuẩn chọn lọc được” cũng bao gồm các gen mã hóa dấu chuẩn tiết ra được mà sự tiết ra của chúng có thể được phát hiện dưới dạng phương tiện để nhận dạng hoặc chọn lọc các tế bào được biến nạp. Ví dụ về các dấu chuẩn mã hóa kháng nguyên tiết ra được mà có thể được nhận dạng bằng tương tác với kháng thể, hoặc ngay cả các enzyme tiết ra được mà có thể được phát hiện theo cách xúc tác. Các protein dấu chuẩn tiết ra được được tiết ra được chia thành một số nhóm, bao gồm các protein nhỏ khuếch tán được mà phát hiện được, (ví dụ, bằng phương pháp ELISA), enzyme nhỏ hoạt động mà phát hiện được trong dung dịch ngoại bào (ví dụ, alpha-amylaza, beta-lactamaza, phosphinothrixin transferaza), hoặc các protein mà được chèn hoặc bẫy trong thành tế bào (như các protein bao gồm trình tự dẫn như các

protein được phát hiện trong đơn vị biểu hiện kéo dài hoặc protein có liên quan đến sự gây bệnh ở cây thuốc lá, còn gọi là PR-S thuốc lá). Các gen đầu chuẩn chọn lọc được khác có thể dùng đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết.

Biến nạp tế bào

Thuật ngữ “biến nạp” chỉ việc đưa axit nucleic vào vật chủ nhận. Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “vật chủ” chỉ vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật, bao gồm tế bào, mô, cơ quan, hoặc thể hệ con cháu bất kỳ của vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật. Chẳng hạn, tế bào chủ theo sáng chế có thể là tế bào hoặc sinh vật bất kỳ, như tế bào thực vật, tế bào tảo, tảo, tế bào nấm, nấm, tế bào vi khuẩn, hoặc tế bào côn trùng. Vật chủ và tế bào được biến nạp có thể bao gồm tế bào từ: thực vật, *Aspergillus*, nấm men, côn trùng, vi khuẩn và tảo. Các mô và tế bào thực vật đặc biệt được quan tâm bao gồm hạt nguyên sinh, máu, rễ, củ, hạt, thân, lá, cây giống, phôi, và phần hoa.

Như được sử dụng trong bản mô tả, thuật ngữ “được biến nạp” chỉ tế bào, mô, cơ quan, hoặc sinh vật mà phân tử polynucleotit lạ, như cấu trúc, được đưa vào đó. Phân tử polynucleotit được đưa vào có thể được kết hợp vào ADN hệ gen của tế bào, mô, cơ quan, hoặc sinh vật nhận sao cho phân tử polynucleotit được đưa vào này được di truyền bởi thế hệ con cháu tiếp theo. Tế bào hoặc sinh vật “chuyển gen” hoặc “được biến nạp” cũng bao gồm thế hệ con cháu của tế bào hoặc sinh vật và thế hệ con cháu được tạo ra từ chương trình nhân giống có sử dụng sinh vật chuyển gen này làm bố mẹ trong phép lai và biểu hiện kiểu hình thay đổi thu được từ sự có mặt của phân tử polynucleotit lạ này. Thuật ngữ “chuyển gen” chỉ vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật chứa một hoặc nhiều phân tử axit polynucleic khác loại.

Có nhiều phương pháp để đưa phân tử axit polynucleic vào tế bào thực vật. Phương pháp có thể thường bao gồm các bước chọn tế bào chủ thích hợp, biến nạp tế bào chủ bằng vector tái tổ hợp, và thu tế bào chủ được biến nạp. Các phương pháp thích hợp bao gồm nhiễm vi khuẩn (ví dụ, *Agrobacterium*), vector nhiễm sắc thể nhân tạo nhị thể của vi khuẩn, phân phối ADN trực tiếp (ví dụ, phương pháp biến nạp bằng PEG, phương pháp hấp thụ ADN qua làm khô/ức chế (desiccation/inhibition-mediated DNA uptake), điện chuyển, khuấy với sợi cacbua silic, và gia tốc các hạt phủ ADN. (được điểm trong Potrykus, et al., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 205, 1991).

Kỹ thuật đưa phân tử ADN vào tế bào đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này biết rõ. Các phương pháp và vật liệu để biến nạp tế bào thực vật bằng cách đưa cấu trúc ADN thực vật vào hệ gen thực vật có thể bao gồm phương pháp bất kỳ đã biết rõ và đã được chứng minh. Phương pháp biến nạp bất kỳ có thể được dùng để biến nạp tế bào chủ bằng một hoặc nhiều phân tử ADN theo sáng chế.

Thực vật chuyển gen được tái tạo có thể tự thụ phấn để tạo ra thực vật chuyển gen đồng hợp tử. Theo cách khác, phấn hoa thu được từ thực vật chuyển gen được tái tạo có thể được lai với thực vật không chuyển gen, tốt hơn là dòng lai cùng dòng của các loài được quan tâm trong nông học. Các phương pháp gây giống thường dùng để tạo ra các đặc tính và cây trồng khác nhau được mô tả trong các tài liệu tham khảo sau, xem, ví dụ, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98, 1960; Simmonds, *Principles of crop improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399, 1979; Sneep and Hendriksen, *Plant breeding perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979; Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, Monograph, 16:249, 1987; Fehr, *Principles of variety development, Theory and Technique*, (Vol. 1) và *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376, 1987. Trái lại, phấn hoa từ thực vật không chuyển gen có thể được sử dụng để thụ phấn cho thực vật chuyển gen được tái tạo.

Thực vật được biến nạp có thể được phân tích về sự có mặt của gen cần quan tâm và mức độ biểu hiện và/hoặc protein tạo ra bởi yếu tố điều hòa được mô tả ở đây. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực đã biết đến nhiều phương pháp phân tích thực vật biến nạp. Ví dụ, các phương pháp phân tích thực vật bao gồm phép thâm tách Southern hoặc Northern, các kỹ thuật dựa trên PCR, phân tích hóa sinh, phương pháp sàng lọc kiểu hình, đánh giá đồng ruộng, và thử nghiệm chẩn đoán miễn dịch. Mức độ biểu hiện của phân tử polynucleotit phiên mã được có thể được xác định bằng thuốc thử TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) và phương pháp theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thời gian cho chu kỳ PCR được xác định bằng phương tiện TaqMan® Testing Matrix. Theo cách khác, thuốc thử Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) và phương pháp theo hướng dẫn của nhà sản xuất có thể được sử dụng để đánh giá mức biểu hiện của gen chuyển.

Hạt thực vật theo sáng chế có thể thu hoạch từ thực vật chuyển gen tốt giống và dùng để trồng các thế hệ con của thực vật được biến nạp theo sáng chế, bao gồm các dòng thực vật lai chứa cấu trúc theo sáng chế và biểu hiện gen được quan tâm trong nông học.

Sáng chế cũng đề xuất bộ phận của thực vật theo sáng chế. Bộ phận của thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lá, thân, rễ, củ, hạt, nội nhũ, noãn, và phần hoa. Sáng chế cũng bao gồm và đề xuất tế bào thực vật biến nạp chứa phân tử axit nucleic theo sáng chế.

Thực vật chuyển gen có thể truyền phân tử polynucleotit chuyển gen cho hệ hệ con của nó. Thế hệ con bao gồm bộ phận hoặc hạt của thực vật được tái tạo bất kỳ chứa gen chuyển thu được từ thực vật gốc. Tốt hơn nếu thực vật chuyển gen là đồng hợp tử về phân tử polynucleotit được biến nạp và truyền trình tự đó cho mọi thế hệ con thu được từ sinh sản giới tính. Thế hệ con có thể được trồng từ hạt được tạo ra bởi thực vật chuyển gen. Thực vật bổ sung này sau đó có thể tự thụ phấn để tạo ra dòng nhân giống thực sự của thực vật. Thế hệ con từ các thực vật này được đánh giá về mức biểu hiện gen trong số các đặc tính khác. Mức biểu hiện gen có thể xác định bằng một số phương pháp thông thường như phép thẩm tách western, thẩm tách northern, kết tủa miễn dịch, và ELISA.

Sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn thông qua việc tham chiếu đến các ví dụ sau đây, mà chỉ nhằm mục đích minh họa. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này cần hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong phần ví dụ sau là các kỹ thuật do các tác giả sáng chế tìm ra để phát huy chức năng tốt trong việc thực hiện sáng chế. Các ví dụ không nằm trong phạm vi yêu cầu bảo hộ chỉ nhằm mục đích minh họa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các yếu tố điều hòa phân lập từ *cây ngô* và nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã tương ứng

Các yếu tố điều hòa được phân lập từ cây ngô, và trình tự của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã (EXP) bao gồm các yếu tố điều hòa của cây ngô đã được xây dựng.

Việc trồng hạt ngô sớm vào đầu tháng 4 ở miền Nam nước Mỹ đặt ra các nguy cơ bất lợi tiềm tàng đối với hạt ngô. Ví dụ, điều kiện lạnh và ẩm kéo dài có thể ngăn sự nảy mầm và phát triển cây giống tối ưu. Qua việc xác định profin phiên mã và xác định đặc tính sau đó, đã nhận dạng được một số gen tiềm năng mà thể hiện phổ biến hiện hữu dụng để phát triển hạt và nảy mầm. Trình tự khởi đầu và trình tự dẫn từ gen tiềm năng, sau đây gọi là P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:2) và L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4), lần lượt được khuếch đại, từ ADN hệ gen của cây ngô, và tách dòng và xác định trình tự.

Các đoạn mồi khuếch đại được thiết kế dựa trên các trình tự của hệ gen thuộc sở hữu và công khai và trình tự EST, mà sau đó được dùng với thư viện GenomeWalker™ (Clontech Laboratories, Inc, Mountain View, CA) được tạo ra theo quy trình của nhà sản xuất để tách dòng đầu 5' của trình tự ADN hệ gen tương ứng. Bằng cách sử dụng trình tự này, các yếu tố điều hòa được nhận dạng bằng tin sinh trong vùng 5' của gen. Bằng các kết quả của phép phân tích này, các yếu tố điều hòa được xác định trong đoạn trình tự phía trên đầu 5' của trình tự gen mã hóa. Sau đó, các đoạn mồi được thiết kế để khuếch đại yếu tố điều hòa. Phân tử ADN tương ứng với mỗi yếu tố điều hòa được khuếch đại bằng các điều kiện PCR chuẩn bằng các đoạn mồi chứa các vị trí enzym giới hạn riêng và ADN hệ gen phân lập từ cây ngô. Trình tự được tách dòng bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự phía trên đầu 5' UTR của vùng mã hóa protein của gen cây ngô. Đoạn ADN thu được được ghép vào vector biểu hiện thực vật cơ bản bằng phương pháp tác động ADN chuẩn và được xác định trình tự.

Trình tự của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã ("EXP") được nhận dạng đề xuất trong bản mô tả là SEQ ID NO: 1, 6, và 8, như liệt kê trong Bảng 1 dưới đây. Trình tự khởi đầu được đề xuất trong bản mô tả là SEQ ID NO: 2. Trình tự dẫn được đề xuất trong bản mô tả là SEQ ID NO: 4. Các trình tự intron được đề xuất trong bản mô tả là SEQ ID NO: 5, 7, và 9.

Bảng 1. Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã (“EXP”), trình tự khởi đầu, trình tự dẫn, và intron phân lập từ loài cỏ.

Chú thích	SEQ ID NO:	Mô tả và/hoặc yếu tố điều hòa của EXP liên kết theo hướng 5' đến 3'
EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1	1	EXP: P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:2); L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4); I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO:5)
P-Zm.Nac-1:1:2	2	Trình tự khởi đầu
P-Zm.Nac-1:1:2 + L-Zm.Nac-1:1:1	3	Trình tự khởi đầu + Trình tự dẫn
L-Zm.Nac-1:1:1	4	Trình tự dẫn
I-Zm.DnaK-1:1:1	5	Intron
EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1	6	EXP: P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:2); L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4); I-Os.FBA-1-1:1:1 (SEQ ID NO:7)
I-Os.FBA-1-1:1:1	7	Intron
EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1	8	EXP: P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:2); L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4); I-Os.Cab-1-1:1:1 (SEQ ID NO:9)
I-Os.Cab-1-1:1:1	9	Intron

Như được thể hiện trong Bảng 1, ví dụ, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã (EXP) gọi là EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO:1), với các thành phần phân lập từ *cây ngô*, bao gồm yếu tố trình tự khởi đầu, P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:3), liên kết theo kiểu hoạt động được đầu 5' với yếu tố trình tự dẫn, L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4), liên kết theo kiểu hoạt động được đầu 5' với yếu tố intron, I-Zm.DnaK-1:1:1 (SEQ ID NO:5). Các EXP khác được liên kết tương tự, như thể hiện trên Bảng 1.

Ví dụ 2

Phân tích EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO:1) điều khiển GUS ở cây ngô chuyển gen F1

Cây ngô được biến nạp bằng vector biểu hiện thực vật pMON73501, chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO:1) điều khiển sự biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS), và thực vật thu được được phân tích về mức biểu hiện protein GUS.

Trình tự EXP được tách dòng vào cấu trúc plasmit biến nạp nhị thể bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Cấu trúc plasmit biểu hiện thực vật thu được,

pMON73501, chứa vùng bờ phải từ *A. tumefaciens*, gen catxet chuyển gen thứ nhất để kiểm tra nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO:1) liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa β -glucuronidaza (GUS, SEQ ID NO:14), liên kết theo kiểu hoạt động được đầu 5' với vùng 3' UTR T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO:10); catxet chuyển gen chọn lọc thứ hai để chọn lọc tế bào thực vật được biến nạp mà tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat điều khiển bởi trình tự khởi đầu CaMV 35S, EXP-CaMV.35S:1:1 (SEQ ID NO:15), và vùng bờ trái từ *A. tumefaciens*. Plasmid thu được được dùng để biến nạp cây ngô.

Cây ngô được biến nạp bằng vector biểu hiện GUS, pMON73501. Thể biến nạp thể hệ R₀, được chọn bằng các đoạn chèn một bản sao được lai với cây LH244 không biến nạp để tạo ra quần thể biến nạp F1. Mức biểu hiện GUS được xác định trong các mô được chọn theo tiến trình phát triển. Các mô F1 được dùng trong nghiên cứu này bao gồm: phôi hạt ẩm, nội nhũ hạt ẩm, rễ, và bao lá mầm sau khi nảy mầm (DAG) 3 ngày; lá và rễ ở giai đoạn V3; rễ và lá trưởng thành ở giai đoạn V7; rễ, lá trưởng thành và lá già, lõi, râu, đốt, bao phấn, và phần hoa ở giai đoạn VT (giai đoạn bẻ cờ, trước khi sinh sản); nhân hạt (phần bên trong vỏ hạt - kernel) 7 ngày sau khi thụ phấn (DAP) và; phôi và nội nhũ 21 và 35 DAP. Các mẫu mô được chọn cũng được phân tích ở các thực vật F1 phơi nhiễm với các điều kiện khô hạn và lạnh bất lợi. Mô rễ và lá V3 được lấy mẫu sau khi phơi nhiễm điều kiện lạnh và khô hạn, cũng như hai ngày sau khi phục hồi sau phơi nhiễm lạnh (2 DAR).

Điều kiện khô hạn bất lợi được tạo ra đối với F1, thực vật V3 bằng cách ngừng tưới nước trong 4 ngày để hàm lượng nước giảm ít nhất 50% lượng nước ban đầu của cây được tưới đầy đủ. Quy trình khô hạn bao gồm chủ yếu các bước sau. Thực vật ở giai đoạn V3 được ngừng tưới. Khi cây ngô bị khô hạn, hình dạng lá thay đổi từ khỏe mạnh bình thường và trải rộng thành lá nhăn lại ở bó mạch gân giữa và có hình dạng chữ V khi quan sát từ đầu lá đến cuống lá. Sự thay đổi hình thái này thường bắt đầu xảy ra khoảng 2 ngày sau khi ngừng tưới và đã cho thấy trong những thử nghiệm trước đó là có liên quan đến sự mất nước khoảng 50% xác định bằng trọng lượng chậu trước khi ngừng tưới và trọng lượng chậu khi quan sát được hình thái cong của lá ở cây không được tưới. Thực vật được xem là đang trong điều kiện khô hạn nếu lá bị héo với bằng chứng là hình dạng cong vào (hình chữ V) của lá. Mức độ bất lợi như vậy được xem là dạng bất lợi không gây chết. Khi mỗi cây thể hiện là bị khô hạn như xác định

trên đây, cây được hủy để thu cả mẫu rễ và lá. 4 cây được dùng đối với mỗi vector và các số đo GUS thu được như mô tả dưới đây.

Ngoài khô hạn, sự nảy mầm thành cây giống F1 và thực vật được biến nạp F1 ở giai đoạn V3 bằng pMON73501 cũng được phơi nhiễm với điều kiện lạnh để xác định xem yếu tố điều hòa có thể hiện khả năng biểu hiện cảm ứng bởi điều kiện lạnh của GUS. 60 hạt thu được từ 10 sự kiện biến nạp, mỗi sự kiện 6 hạt, được thử nghiệm về khả năng cảm ứng sự biểu hiện gen trong điều kiện lạnh. Các hạt được cho nảy mầm trong đĩa Petri trên giấy lọc thấm đầy nước. Ba ngày sau khi nảy mầm, cây giống con được phơi nhiễm trong điều kiện bất lợi lạnh bằng cách đặt đĩa Petri chứa cây giống này mầm trong buồng sinh trưởng tối ở nhiệt độ 10°C trong 24 giờ. Cuối khoảng thời gian 24 giờ, mô rễ và mô bao lá mầm được lấy mẫu để định lượng sự biểu hiện GUS như mô tả dưới đây. Toàn bộ cây được thử nghiệm về khả năng cảm ứng biểu hiện GUS trong điều kiện bất lợi lạnh ở giai đoạn V3. 20 cây ngô ở giai đoạn V3, gồm 2 cây từ mỗi sự kiện trong số 10 sự kiện biến nạp, được cho phơi nhiễm với nhiệt độ 12°C trong buồng sinh trưởng trong 24 giờ. Cây trong buồng sinh trưởng được trồng trong luồng ánh sáng trắng 800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ với chu kỳ sáng là 10 giờ ánh sáng trắng và 14 giờ tối. Sau khi phơi nhiễm, mô lá và mô rễ được thu mẫu để biểu hiện GUS định lượng.

Phép phân tích mô hóa học GUS được dùng để phân tích sự biểu hiện định tính của thực vật được biến nạp. Toàn bộ các đoạn mô được ủ trong dung dịch nhuộm GUS X-Gluc (5-bromo-4-clo-3-indolyl-b-glucuronit) (1 mg/ml) trong khoảng thời gian đủ dài, rửa, và kiểm tra sự bắt màu xanh bằng mắt thường. Hoạt tính GUS được xác định định tính bằng cách kiểm tra trực tiếp bằng mắt hoặc kiểm tra bằng kính hiển vi sử dụng các cơ quan và mô chọn lọc.

Để phân tích định lượng, protein tổng số được chiết từ mô chọn lọc của cây ngô đã biến nạp. 1 microgam protein tổng số được dùng với cơ chất tạo huỳnh quang 4-metyleumbelliferyl- β -D-glucuronit (MUG) trong tổng thể tích phản ứng 50 μl . Cường độ huỳnh quang được đo với bước sóng kích thích 365 nm, bước sóng phát xạ ở 445 nm, bằng Fluoromax-3 (Horiba; Kyoto, Japan) với bộ đọc Micromax Reader, với khe được thiết lập khi kích thích là 2 nm và khi phát xạ là 3nm.

Bảng 2 dưới đây thể hiện giá trị trung bình của mức biểu hiện GUS trong các mô chọn lọc ở thực vật F1 được biến nạp pMON73501.

Bảng 2. Trị số biểu hiện GUS trung bình của các mô chọn lọc và xử lý cây ngô được biến nạp thể hệ F1, biến nạp bằng pMON73501.

Giai đoạn	Cơ quan	Điều kiện cảm ứng	Trung bình	Sai số chuẩn (SE)
Hạt ngâm	Phôi		1730,43	260,50
Hạt ngâm	Nội nhũ		535,57	109,12
3 DAG	Rễ		290,78	65,98
3 DAG	Rễ	Lạnh	250,15	46,41
V3	Rễ		295,14	74,69
V3	Rễ	Lạnh	472,15	115,41
V3	Rễ	Lạnh 2 DAR	104,04	25,67
V3	Rễ	Khô hạn	384,97	66,98
V7	Rễ		125,12	24,65
VT	Rễ		57,80	13,56
3 DAG	Bao lá mầm		205,49	34,89
3 DAG	Bao lá mầm	Lạnh	249,79	37,83
V3	Lá		66,34	18,55
V3	Lá	Lạnh	290,51	89,09
V3	Lá	Lạnh 2 DAR	417,18	85,36
V3	Lá	Khô hạn	120,23	35,30
V7	Lá – trưởng thành		45,60	10,66
VT	Lá - trưởng thành		57,30	14,15
VT	Lá - già		195,07	59,39
VT	Lõi		275,58	53,56
VT	Râu		39,95	11,46
VT	Đốt		155,98	51,01
VT	Bao phấn		474,59	100,53
VT	Phấn hoa		35,06	24,11
21 DAP	Phôi		622,61	65,11
35 DAP	Phôi		1140,81	135,70
7 DAP	Nhân hạt		350,35	20,28
21 DAP	Nội nhũ		684,27	64,73
35 DAP	Nội nhũ		738,38	96,71

Như được thể hiện trong Bảng 2, một đặc điểm nổi bật về mức biểu hiện do trình tự EXP, EXP-Zm.Nac+Zm.DnaK:1:1 (SEQ ID NO:1), bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự dẫn P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:2) và L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:3) điều khiển là quan sát được mức biểu hiện cao ở các mô phôi hạt ẩm và mô nội nhũ so với các mô khác được lấy mẫu. Mức biểu hiện cao có thể là ưu điểm đối với sự nảy mầm của hạt biểu hiện gen chuyển hữu dụng để tạo ra sự bảo vệ chống lại điều kiện lạnh và ẩm bất lợi. Mức biểu hiện ở phôi và nội nhũ cũng cao hơn so với các mô khác trong giai đoạn phát triển sớm của hạt (21 và 35 DAP). Phổ biểu hiện này cũng có thể có lợi để tạo điều kiện nảy mầm và sinh trưởng hạt thu được. Ví dụ, protein hoặc sản phẩm thu được từ sự biểu hiện gen chuyển liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu Nac và trình tự dẫn của cây ngô được biểu hiện ở các giai đoạn sớm của quá trình phát triển hạt có thể dẫn đến sự tích tụ protein hoặc sản phẩm thu được đó trong quá trình phát triển hạt cần bảo quản để dùng nhanh khi nảy mầm trong điều kiện lạnh hoặc ẩm. Sự biểu hiện khi nảy mầm có thể tạo ra các ưu điểm khác cho hạt điều khiển các gen chuyển mong muốn bằng cách cho phép biểu hiện thêm protein hoặc sản phẩm thu được ở thời điểm tới hạn trong điều kiện lạnh và ẩm bất lợi. Quan sát được ảnh hưởng nhẹ của điều kiện lạnh đối với lá và rễ V3 trong thử nghiệm này.

Ví dụ 3

Phân tích các yếu tố điều hòa điều khiển GUS ở cây ngô chuyển gen R0

Cây ngô được biến nạp bằng vector biểu hiện thực vật chứa trình tự EXP điều khiển sự biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS), và thực vật thu được được phân tích về mức biểu hiện protein GUS. Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã được tách dòng vào cấu trúc plasmit biến nạp nhị thể bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực.

Cấu trúc plasmit biểu hiện ở thực vật thu được chứa vùng bờ phải từ *A. tumefaciens*, catxet chuyển gen đầu tiên để kiểm tra trình tự EXP và tổ hợp 3' UTR bao gồm trình tự EXP (được thể hiện trong Bảng 3), liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa β -glucuronidaza (GUS, SEQ ID NO:14), liên kết theo kiểu hoạt động được đầu 5' với vùng tận cùng 3' (được thể hiện trong Bảng 3); catxet chọn lọc gen chuyển thứ hai được dùng để chọn tế bào thực vật đã biến nạp mà tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat (CP4, US RE39247, điều khiển bởi trình tự khởi đầu Actin

1 của lúa, EXP-Os.Act1:1:1, SEQ ID NO:16), và vùng bờ trái từ *A. tumefaciens*. Plasmid thu được được dùng để biến nạp cây ngô. Bảng 3 liệt kê tên các plasmid, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, mà cũng được mô tả trong Bảng 1, và các 3' UTR được đặt trong liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa GUS. Mỗi cấu trúc plasmid bao gồm một cấu hình catxet chuyển gen riêng gồm các intron đặc hiệu và 3' UTR đặt trong liên kết theo kiểu hoạt động được với trình tự khởi đầu và trình tự dẫn P-Zm.Nac-1:1:2 (SEQ ID NO:3) và L-Zm.Nac-1:1:1 (SEQ ID NO:4).

Bảng 3. Các cấu trúc plasmid GUS và nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã và 3' UTR tương ứng.

Cấu trúc plasmid	Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã	SEQ ID NO:	3' UTR	SEQ ID NO:
pMON122713	EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1	6	T-Os.Mth-1:1:1	12
pMON122715	EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1	6	T-Os.CLUS33428_1-1:1:1	11
pMON127422	EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1	8	T-Os.Ara5-1:1:1	13
pMON128892	EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1	8	T-Os.Mth-1:1:1	12

Thực vật được biến nạp bằng các sử dụng phương pháp biến nạp qua *Agrobacterium* đã biết trong lĩnh vực này. Phép phân tích mô hóa học và định lượng GUS được tiến hành như mô tả trong Ví dụ 2 trên đây. Mức biểu hiện GUS trung bình của R₀ quan sát được đối với mỗi cây ngô được biến nạp catxet chuyển gen GUS được thể hiện trên Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Mức biểu hiện GUS trung bình R_0 ở mô rễ và mô lá.

Giai đoạn	Cơ quan	Mức biểu hiện GUS trung bình			
		pMON122713	pMON122715	pMON127422	pMON128892
V3	Lá	nd	128,28	65,73	nd
	Rễ	nd	73,61	nd	nd
V4	Lá	7,47	Nd	nd	261,38
	Rễ	3,15	Nd	nd	nd
V7	Lá	nd	110,47	34,18	68,43
	Rễ	nd	11,17	5,57	nd
VT	Lá	5,81	42,23	87,04	102,55
	Rễ	2,02	26,34	1,16	20,76
	Bao phần	20,45	115,86	22,47	145,84
VT/R1	Râu	46,33	18,63	97,14	nd
R3	21DAP-Phôi	229,75	165,29	385,4	220,5
	21DAP-Nội nhũ	40,47	215,04	192,02	223,77

Phù hợp với các kết quả thu được trong Ví dụ 2, Bảng 4 thể hiện rằng mức biểu hiện cao nhất là ở phôi đang phát triển (21 DAP) đối với cả 4 catxet chuyển gen. FIG. 1 minh họa các phổ biểu hiện khác nhau do từng cấu hình catxet chuyển gen tạo ra. Mức biểu hiện ở phôi đang phát triển là cao nhất đối với catxet chuyển gen chứa trình tự EXP, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO:8), mà được liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR, T-Os.Ara5-1:1:1 (SEQ ID NO:13) so với ba catxet chuyển gen khác. Mức biểu hiện tương tự quan sát được ở phôi và nội nhũ đang phát triển ở thực vật được biến nạp bằng catxet biểu hiện chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO:8), mà liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:12). Đối với catxet chuyển gen chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO:6), mà liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:12), mức biểu hiện ở nội nhũ thấp hơn nhiều so với mức biểu hiện ở phôi. Đối với catxet chuyển gen chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO:6), mà liên kết theo kiểu hoạt động được với 3'

UTR, T-Os.CLUS33428_1-1:1:1 (SEQ ID NO:11), mức biểu hiện ở phôi thấp hơn so với mức biểu hiện ở nội nhũ. Mỗi cấu hình catxet chuyển gen tạo ra một phổ biểu hiện riêng ở hạt R₀ đang phát triển.

Cũng quan sát được sự khác biệt về mức biểu hiện ở rễ, lá, bao phấn, và râu, cũng hạt đang phát triển của thực vật được biến nạp bằng 4 catxet chuyển gen khác nhau. FIG. 2 minh họa các phổ biểu hiện khác nhau do từng cấu hình catxet chuyển gen tạo ra trong mỗi mô được mô tả trên đây. Ví dụ, mức biểu hiện ở lá với các catxet chuyển gen chứa trình tự EXP, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO:8) cao hơn so với catxet chuyển gen chứa EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO:6). Mức biểu hiện ở bao phấn cao hơn với hai catxet chuyển gen chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, EXP-Zm.Nac+Os.FBA:1:1 (SEQ ID NO:6), mà liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR, T-Os.CLUS33428_1-1:1:1 (SEQ ID NO:11) và nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, EXP-Zm.Nac+Os.Cab-1:1:1 (SEQ ID NO:8), mà liên kết theo kiểu hoạt động được với 3' UTR, T-Os.Mth-1:1:1 (SEQ ID NO:12). Mỗi cấu hình trong số 4 cấu hình catxet chuyển gen tạo ra phổ biểu hiện riêng ở các thể biến nạp R₀.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm:

a) trình tự có độ tương đồng về trình tự ít nhất 95% với trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó trình tự này có hoạt tính của trình tự khởi đầu;

b) trình tự chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và

c) đoạn trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu;

trong đó trình tự đã nêu được liên kết theo cách hoạt động được với phân tử polynucleotit khác loại phiên mã được.

2. Phân tử ADN theo điểm 1, trong đó đoạn đã nêu chứa SEQ ID NO: 2.

3. Phân tử ADN theo điểm 1, trong đó phân tử polynucleotit khác loại phiên mã được chứa gen được quan tâm trong nông nghiệp.

4. Phân tử ADN theo điểm 3, trong đó:

(i) gen được quan tâm trong nông nghiệp tạo ra khả năng dung nạp chất diệt cỏ ở thực vật; hoặc

(ii) gen được quan tâm trong nông nghiệp tạo ra khả năng kháng loài gây hại ở thực vật.

5. Tế bào thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN khác loại chứa trình tự được chọn từ nhóm gồm:

a) trình tự có độ tương đồng về trình tự ít nhất 95% với trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó trình tự này có hoạt tính của trình tự khởi đầu;

b) trình tự chứa trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8; và

c) đoạn trình tự bất kỳ nêu trong SEQ ID NO: 1, 3, 6, hoặc 8, trong đó đoạn này có hoạt tính của trình tự khởi đầu;

trong đó trình tự đã nêu được liên kết theo cách hoạt động được với phân tử polynucleotit khác loại phiên mã được.

6. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 5, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này:

(i) là tế bào thực vật một lá mầm; hoặc

(ii) là tế bào thực vật hai lá mầm.

7. Thực vật chuyển gen, hoặc bộ phận của nó, chứa phân tử ADN theo điểm 1.

8. Hạt chuyển gen chứa phân tử ADN theo điểm 1.

9. Cây con của thực vật chuyển gen theo điểm 7, hoặc bộ phận của cây, trong đó cây con hoặc bộ phận của cây chứa phân tử ADN đã nêu.

10. Catxet chuyển gen chứa phân tử ADN được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 1, 6, và 8, trong đó phân tử ADN này được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo cách hoạt động được với 3' UTR được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 10, 11, 12, và 13.

11. Catxet chuyển gen theo điểm 10, trong đó catxet này chứa phân tử ADN nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó phân tử ADN này được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo cách hoạt động được với 3' UTR nêu trong SEQ ID NO: 10.

12. Catxet chuyển gen theo điểm 10, trong đó catxet này chứa phân tử ADN nêu trong SEQ ID NO: 6, trong đó phân tử ADN được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo cách hoạt động được với 3' UTR được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 11 và 12.

13. Catxet chuyển gen theo điểm 10, trong đó catxet này chứa phân tử ADN nêu trong SEQ ID NO: 8, trong đó phân tử ADN được liên kết theo cách hoạt động được với trình tự mã hóa khác loại mà được liên kết theo cách hoạt động được với 3' UTR được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO: 12 và 13.

14. Phương pháp biểu hiện phân tử polynucleotit phiên mã được bao gồm bước thu thực vật chuyển gen theo điểm 7 và trồng thực vật này, trong đó polynucleotit phiên mã được được biểu hiện.

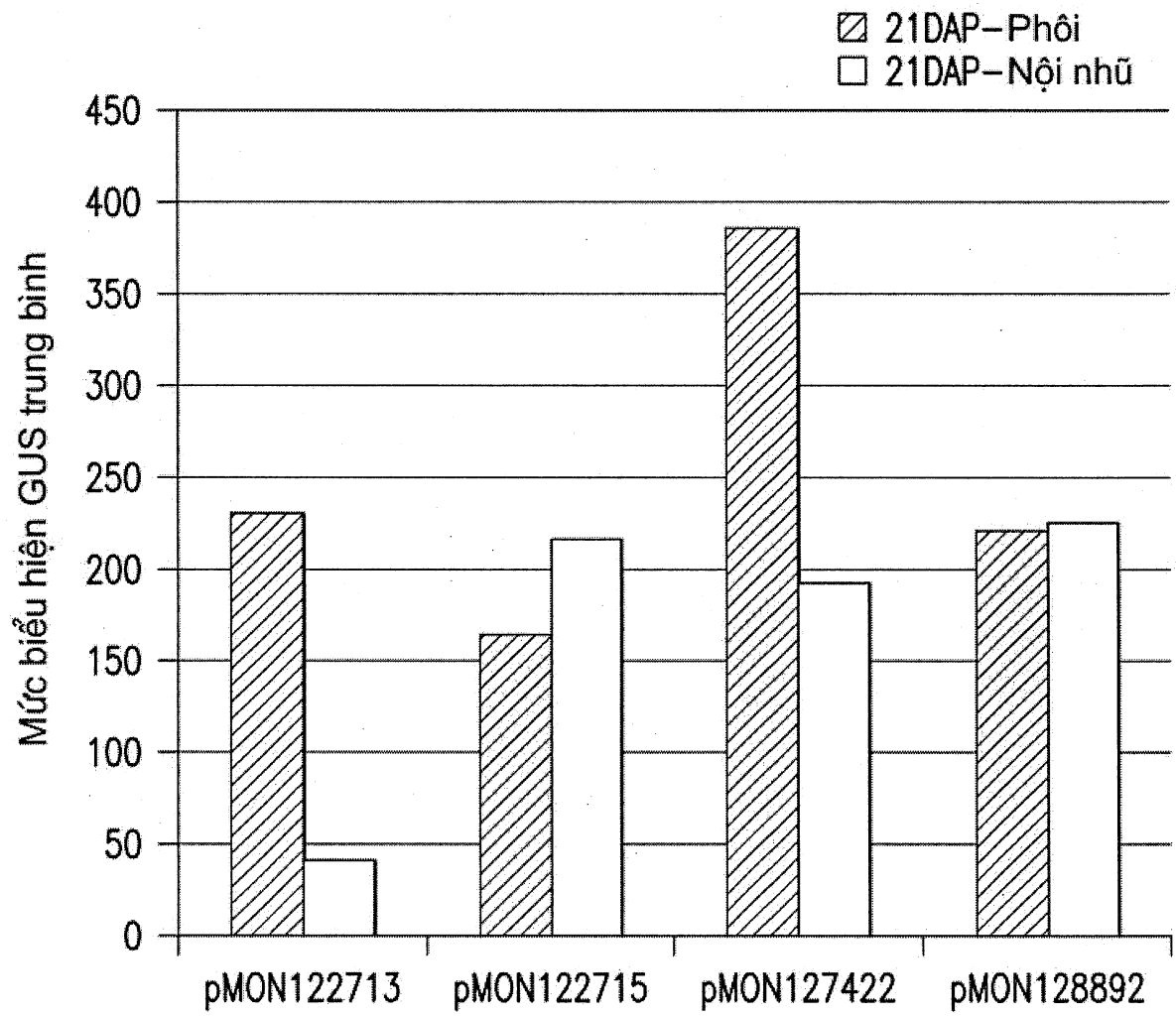


FIG.1

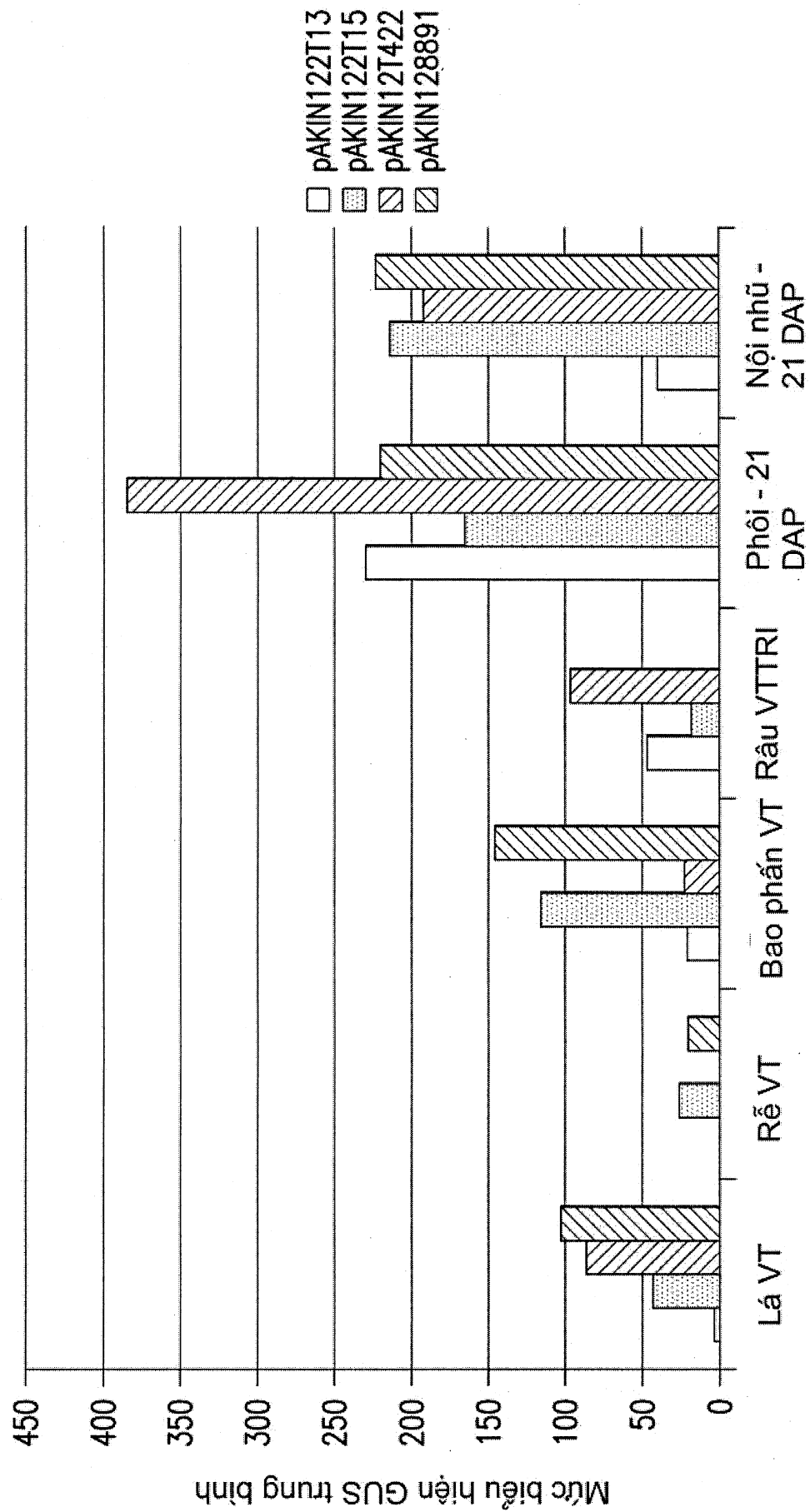


FIG.2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC
 Ahrens, Jeffrey E.
 Cherian, Shoba
 Loida, Paul J.
 Lutfiyya, Linda L.
 Wu, Wei
 Xie, Jiali

<120> Phân tử ADN điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật, thực vật, tế bào thực vật và hạt chuyển gen chứa phân tử ADN này

<130> MONS:326WO

<140> Không rõ

<141> 2013-04-10

<150> 61/635,945

<151> 2012-04-20

<150> 13/830,403

<151> 2013-03-14

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2305

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã thể khảm

<400> 1

gaggtgcata aggctggcaa gacgacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg	60
cgataagggt agcgcatgcg tcgaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct	120
attgggtagc gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtggagg atggcagtgg tggcatgcát	180
ggacgcgggt ggagcatacg cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg	240
gttgagcgcg ccgcgggcca gatggcgggc atggttagag cgcccgtggt tacgggtggg	300
ttcatggcga gcgagggggt tgcaagattt ccagggcgct cgggtcgggt gcaagctcca	360
cgggtggaggc gtgacggaga cgacgtgggg agggaggctg tggggaaatt cggacgagca	420
gaggcgtggc aggtgtggca tggggagggg ggtcgcgggg agggcgagcagg gaggtggcat	480
ggggagggag gctggggacg aagatgatgt gggcccagag ggacgcggga caaagaattg	540
cgatatgataa cgggttgatt cgtagaattt taggcggtat ttataaaaaat gacgcaggac	600
agccattggt actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa	660
caagaccaca cgtactaaca tttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg	720
ataagcgagc tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag	780
ctgtagcaat taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aaatcataat	840
catgaatgct ccaaaatcag ctagctgggt ctcccttatac ttcgtttttct cttotttctcc	900
tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtgggt actaactccc	960
aactacgcac ctaccgcgcg cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc	1020
cgctcgactca tccttatcct ccccatcacg ctaccccgcg gcccgacccg cgccatccgt	1080

actttcccg	cgccccacc	gctggccgcc	ccgacgtgtc	gcgccgccac	cggaaggtcc	1140
cgggccgtcg	ggcgggcaga	gcgcctgcag	cggtggaccc	acgccacgct	gacgcgggcg	1200
cgcgtccgtc	caagaaacct	gacgtaagca	gtgacagaat	tggcgccgcc	tctcggcgtc	1260
cacgtgtcgt	ggtcaacctg	tcagagtggg	gctccgtgtg	tgcgctaccg	cagggggccc	1320
gcgcacgggc	cacacgtgtc	gcggtcgacc	gcggctataa	atgcccggt	ccgcactcgg	1380
aacaagtttc	aagctctcct	ccctctctcc	taccattagc	agtagccaca	gccagaacac	1440
cagcagacag	cagcatcagc	agggaggaac	acctcgaggc	ctcggactag	tcgagagatc	1500
taccgtcttc	ggtacgcgct	cactccgccc	tctgcctttg	ttactgccac	gtttctctga	1560
atgctctctt	gtgtggtgat	tgctgagagt	ggtttagctg	gatctagaat	tacactctga	1620
aatcgtgttc	tgctgtgct	gattacttgc	cgctctttgt	agcagcaaaa	tatagggaca	1680
tggtagtacg	aaacgaagat	agaacctaca	cagcaatacg	agaaatgtgt	aatttggtgc	1740
ttagcgggat	ttattttaagc	acatgttggg	gttatagggc	acttggtatc	agaagtttgc	1800
tgtaatttta	ggcacaggct	tcatactaca	tgggtcaata	gtatagggat	tcataattata	1860
ggcgatacta	taataatttg	ttcgtctgca	gagcttatta	tttgccaaaa	ttagatattc	1920
ctattctgtt	tttgtttgtg	tgctgttaaa	ttgttaacgc	ctgaaggaat	aaatataaat	1980
gacgaaatth	tgatgtttat	ctctgctcct	ttattgtgac	cataagtcaa	gatcagatgc	2040
acttgthttt	aatattgttg	tctgaagaaa	taagtactga	cagtattttg	atgcattgat	2100
ctgcttgtht	gttgtaacaa	aatttaaaaa	taaagagtht	cctttttgtt	gctctcctta	2160
cctcctgatg	gtatctagta	tctaccaact	gacactatat	tgcttctctt	tacatacgta	2220
tottgctcga	tgcttctctc	ctagtgttga	ccagtgttac	tcacatagtc	tttgctcatt	2280
tcattgtaat	gcagatacca	agcgg				2305

<210> 2
 <211> 1386
 <212> ADN
 <213> Ngô

<400> 2						
gaggtgcata	aggctggcaa	gacgacagtt	aggaacgcat	gcgagcgagg	ttgacggacg	60
cgataagggt	agcgcatgcg	tcgaacgcgg	gctggcgagg	gtggaaggca	tgataaggct	120
attgggtagc	gcaaaatgtg	tagacagcgg	gcgagtgagg	atggcagtg	tgacatgcat	180
ggacgcggtt	ggagcatacg	cgacaagaat	ggagcacgac	gtagatttct	ggaggccgtg	240
gttgagcgc	ccgcgggcga	gatggcgccc	atggttagag	cgcccgtggt	tacgggtggg	300
ttcatggcga	gcggaggggt	tgcaagattt	ccagggcgct	cggtcgggtt	gcaagctcca	360
cgggtggaggc	gtgacggaga	cgacgtgggg	agggaggtcg	tggggaaatt	cggacgagca	420
gaggcgtggc	aggtgtggca	tggggagggg	ggtcgcgggg	agggcgagg	gaggtggcat	480
ggggagggag	gctggggacg	aagatgatgt	gggccagag	ggacgcggga	caaagaattg	540
cgtatgataa	cgggttgatt	cgtagaattt	taggcgggat	ttataaaaa	gacgcaggac	600
agccattggt	actgatactt	taatatagta	gagaagagat	ataaattagg	acgggtacaa	660
caagaccaca	cgtactaaca	tttttttttg	tcacaggctg	ctctaataca	tatctctatg	720
ataagcgagc	tagggatgct	agcgtgtcca	tttgattcct	atataaatct	ccaattatag	780
ctgtagcaat	taattttaata	aacacccaac	aatagatcaa	atctcatagc	aatcataat	840
catgaatgct	caaaaatcag	ctagctggct	ctcccttata	ttcgthtttc	cttcttctcc	900
tgcaacgaaa	agaaaaaaa	agaaaagaaa	agaaaacggc	cgcttggtgt	actaactccc	960

aactacgcac	ctaccgcgcg	cataactctt	ggccgcctgc	cctcatcacc	tccgcgtcgc	1020
cgtcgactca	tccttatcct	ccccatcacg	ctcaccgccg	gcccgaccg	cgccatccgt	1080
actttcccg	ccgccccacc	gctggccgcc	ccgacgtgtc	gcgccgccac	cggaagggtcc	1140
cgggccgtcg	ggcgggcaga	gcgcctgcag	cggtggaccc	acgccacgct	gacgcggggcg	1200
cgcgccgtc	caagaaacct	gacgtaagca	gtgacagaat	tggcgccgcc	tctcggcgtc	1260
cacgtgtcgt	ggtcaacctg	tcagagtggg	gctccgtgtg	tgcgctaccg	cagggggcccg	1320
gcgcacgggc	cacacgtgtc	gcggtcgacc	gcggtctataa	atgcccggt	ccgcaactcgg	1380
aacaag						1386

<210> 3
 <211> 1471
 <212> ADN
 <213> Ngô

<400> 3	
gaggtgcata	aggctggcaa gacgacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg 60
cgataagggt	agcgcatgcg tcgaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct 120
attgggtagc	gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtgagg atggcagtggt tggcatgcat 180
ggacgcgggt	ggagcatacg cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg 240
gttgagcgcg	ccgcgggcga gatggcgccc atggttagag cgcccgtggt tacgggtggg 300
ttcatggcga	gcggaggggt tgcaagattt ccagggcgct cgggtcggtt gcaagctcca 360
cggtggaggc	gtgacggaga cgacgtgggg agggaggtcg tggggaaatt cggacgagca 420
gaggcgtggc	aggtgtggca tggggagggg ggtcgcgggg agggcgcgagg gaggtggcat 480
ggggaggagg	gctggggacg aagatgatgt gggcccagag ggacgcggga caaagaattg 540
cgtagataaa	cgggttgatt cgtagaattt taggcggtat ttataaaaat gacgcaggac 600
agccattggt	actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa 660
caagaccaca	cgtactaaca tttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg 720
ataagcgagc	tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag 780
ctgtagcaat	taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aaatcataat 840
catgaatgct	ccaaaatcag ctagctggct ctcccttatac ttcgtttttc cttctttctcc 900
tgcaacgaaa	agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtggt actaactccc 960
aactacgcac	ctaccgcgcg cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc 1020
cgtcgactca	tccttatcct ccccatcacg ctcaccgccg gcccgaccg cgccatccgt 1080
actttcccg	ccgccccacc gctggccgcc ccgacgtgtc gcgccgccac cggaagggtcc 1140
cgggccgtcg	ggcgggcaga gcgcctgcag cggtggaccc acgccacgct gacgcggggcg 1200
cgcgccgtc	caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgccgcc tctcggcgtc 1260
cacgtgtcgt	ggtcaacctg tcagagtggg gctccgtgtg tgcgctaccg cagggggcccg 1320
gcgcacgggc	cacacgtgtc gcggtcgacc gcggtctataa atgcccggt ccgcaactcgg 1380
aacaagtttc	aagctctcct ccctctctcc taccattagc agtagccaca gccagaacac 1440
cagcagacag	cagcatcagc agggaggaac a 1471

<210> 4
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Ngô

<400> 4
 tttcaagctc tcctccctc ttcctacat tagcagtagc cacagccaga acaccagcag 60
 acagcagcat cagcagggag gaaca 85

<210> 5
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Ngô

<400> 5
 accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa 60
 tgctctcttg tgtgggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
 atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtcctttgta gcagcaaaat atagggacat 180
 ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct 240
 tagcggattt tatttaagca catgttgggt ttatagggca cttggattca gaagtttgct 300
 gttaatttag gcacaggctt catactacat gggcaatag tatagggatt catattatag 360
 gcgatactat aataatttgc tgcctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420
 tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
 acgaaatttt gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540
 cttgttttaa atattgttgc ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgatc 600
 tgcttggttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtttc ctttttggtg ctctccttac 660
 ctctgatgg tatctagtat ctaccaactg aactatatt gcttctcttt acatacgtat 720
 cttgctcgat gccttctccc tagtggtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt 780
 cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

<210> 6
 <211> 2232
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã thể khảm

<400> 6
 gaggtgcata aggctggcaa gacgacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg 60
 cgataagggt agcgcatgcg tcgaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct 120
 attgggtagc gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtgagg atggcagtggt tggcatgcat 180
 ggacgcgggt ggagcatagc cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg 240
 gttggagcgc ccgcgggcga gatggcggcc atgggttagag cggccgtggt tacgggtggg 300
 ttcatggcga gcggagggt tgcaagattt ccagggcgct cgggtcgggt gcaagctcca 360
 cgggtggaggc gtgacggaga cgacgtgggg agggaggtcg tggggaaatt cggacgagca 420
 gaggcgtggc aggtgtggca tggggaggga ggtcgcgggg agggcgcagg gaggtggcat 480
 ggggaggagg gctggggacg aagatgatgt gggccagag ggacgcggga caaagaattg 540
 cgtatgataa cgggttgatt cgtagaattt taggcgttat ttataaaaat gacgcaggac 600
 agccattggt actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa 660
 caagaccaca cgtactaaca tttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg 720
 ataagcgagc tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag 780

ctgtagcaat taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aaatcataat	840
catgaatgct ccaaaatcag ctagctggct ctcccttatac ttcggtttttc cttctttctcc	900
tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttgtggt actaactccc	960
aactacgcac ctaccgcgcg cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc	1020
cgtcgactca tccttatcct ccccatcacg ctcaccccg cccgcgaccg cgccatccgt	1080
actttcccg cgcgccacc gctggccgcc ccgacgtgtc gcgcgccac cggaagggtcc	1140
cgggcccgtc ggccgggcaga gcgcctgcag cgggtgaccc acgccacgct gacgcgggcg	1200
cgcgctccgtc caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgccgcc tctcggcgtc	1260
cacgtgtcgt ggtcaacctg tcagagtggg gctccgtgtg tgcgctaccg caggggcccg	1320
gcgcacgggc cacacgtgtc gcggtcgacc gcggctataa atgcccggct ccgcactcgg	1380
aacaagtttc aagctctcct cccctcttcc taccattagc agtagccaca gccagaacac	1440
cagcagacag cagcatcacg agggaggaac acctgcaggc ctacgctgac aagctgactc	1500
tagcagatcc tctagaacca tcttcacac actcaagcca cactattgga gaacacacag	1560
ggacaacaca ccataagatc tcaagaccgc ggtatgcttt ctgaatatca tccgtactgt	1620
tctatggttt ttggcatgca tttgtttcct ctttatatca atgacaagtg aaggaaacttt	1680
atgtagtttt atgatagata taagcacttt atcgtcagga aatcaaatag gatgtgcagt	1740
caagctaagt tatatatagc agaattcagt gaacataaaa cacttgtttt gatataacat	1800
gattcaaata tactggcatc tctagttcaa atctactctt caaagttata taatgcattt	1860
gaaggaaaat ttctatcttc aacttcacag aaagcaaaat agatatgatt tgtgtatacc	1920
aatgaactt agagactcaa aatatactag taatacattt gtaaactcga catctgcac	1980
aagacatgac atgggttaac cactagcagt tgtaaggata aagcatgaag cattcatgtg	2040
tcctgcttat gttctatgaa ccctctgcag gtcataattc agaagaaaag tttggaactt	2100
ctaactctac aacataacaa gcatactttt atcaactttg gataataaat tcttaagatg	2160
agtttttcat tcaattatgg ttcagaacta gaagattaaa aactttatcc ttcttgctgt	2220
agaaaaccat tg	2232

<210> 7
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

<400> 7	
caagaccgcg gtatgctttc tgaatatcat ccgtactgtt ctatggtttt tggcatgcat	60
ttgtttcctc tttatatcaa tgacaagtga aggaacttta tgtagtttta tgatagatat	120
aagcaacttta tcgtcaggaa atcaaatagg atgtgcagtc aagctaagtt atatatagca	180
gaattcagtg aacataaaac acttgttttg atataacatg attcaaatat actggcatct	240
ctagttcaaa totactcttc aaagttatat aatgcatttg aaggaaaatt tctatcttca	300
acttcacaga aagcaaaata gatatgattt gtgtatacca aatgaactta gagactcaaa	360
atatactagt aatacatttg taaactcgac atctgcatca agacatgaca tgggttaacc	420
actagcagtt gtaaggataa agcatgaagc attcatgtgt cctgcttatg ttctatgaac	480
catctgcagg tcataattca gaagaaaagt ttggaacttc taatcctaca acataacaag	540
catactttta tcaacttttg ataataaatt cttaagatga gtttttcatt caattatgg	600
tcagaactag aagattaaaa actttatcct tcttgctgta gaaaaccatt g	651

<210> 8
 <211> 1629
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã thể khảm

<400> 8
 gaggtgcata aggctggcaa gacgacagtt aggaacgcat gcgagcgagg ttgacggacg 60
 cgataagggt agcgcatgcg tcgaacgcgg gctggcgagg gtggaaggca tgataaggct 120
 attgggtagc gcaaaatgtg tagacagcgg gcgagtgagg atggcagtggt tggcatgcat 180
 ggacgcgggt ggagcatacg cgacaagaat ggagcacgac gtagatttcg ggaggccgtg 240
 gttggagcgc ccgcgggcga gatggcggcc atggttagag cgcccgtggt tacgggtggg 300
 ttcatggcga gcggaggggt tgcaagatct ccagggcgct cgggtcggtt gcaagctcca 360
 cgggtggaggc gtgacggaga cgacgtgggg agggaggtcg tggggaaatt cggacgagca 420
 gaggcgtggc aggtgtggca tggggagggg ggtcgcgggg agggcgagcagg gaggtggcat 480
 ggggagggag gctggggacg aagatgatgt gggcccagag ggacgcggga caaagaattg 540
 cgtatgataa cgggttgatt cgtagaatct taggcggtat ttataaaaat gacgcaggac 600
 agccattggt actgatactt taatatagta gagaagagat ataaattagg acgggtacaa 660
 caagaccaca cgtactaaca tttttttttg tcacaggctg ctctaataca tatctctatg 720
 ataagcgagc tagggatgct agcgtgtcca tttgattcct atataaatct ccaattatag 780
 ctgtagcaat taatttaata aacacccaac aatagatcaa atctcatagc aaatcataat 840
 catgaatgct ccaaaatcag ctagctggct ctcccttctc ttcgtttttc cttcttctcc 900
 tgcaacgaaa agaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaacggc cgcttggtgt actaactccc 960
 aactacgcac ctaccgcgcg cataactctt ggccgcctgc cctcatcacc tccgcgtcgc 1020
 cgtcgactca tccttatcct ccccatcacg ctacccccgc gcccgaccg cgccatccgt 1080
 actttcccg cgcgccacc gctggccgcc ccgacgtgtc gcgccgccac cggaaggtcc 1140
 cgggccgtcg ggcgggcaga gcgcctgcag cgggtggacc acgccacgct gacgcgggcg 1200
 cgcgtccgtc caagaaacct gacgtaagca gtgacagaat tggcgccgcc tctcggcgtc 1260
 cacgtgtcgt ggtcaacctg tcagagtggg gctccgtgtg tgcgctaccg caggggcccg 1320
 gcgcacgggc cacacgtgtc gcggctgacc gcggctataa atgcccggt cgcactcgg 1380
 aacaagtttc aagctctcct cccctcttcc taccattagc agtagccaca gccagaacac 1440
 cagcagacag cagcatcagc agggaggaac acctgcaggc ctacacgctg acaagctgac 1500
 tctagcagat ctccctgcca aggtatatat gctgattgat ttctactctt cctcaattca 1560
 aaattgaaag atattatgct gatctggtta aatttatggt tggtttggtt tggtttcagc 1620
 aaggtgctg 1629

<210> 9
 <211> 117
 <212> ADN
 <213> Oryza sativa

<400> 9
 ccctgccaaag gtatatatgc tgattgattt ctactcttcc tcaattcaaa attgaaagat 60
 attatgctga tctgggttaa tttatgtttg gtttggtttg gtttcagcaa ggtgctg 117

<210> 10
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 10
 gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 11
 <211> 380
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 11
 tcgatcaatc gatcacgtcg tcgtctcggc tcgtcatcaa tcgcgatcga tcggtcgttt 60
 tcacctaata ataataataat catatgtgtg tgtgcaaaga ataacgaatt aacctcccca 120
 agcttcatgt atgcatacat gcatcgttag tgcatgtgtc cctgatcatg ggtctctggg 180
 ggaggatcat gttgtgtcgt gtgtcggctg tgtctcggtt atcgtcttat cgatttcgat 240
 catatcggcc aattgttgtc gcgctggcca cgtatatgta cttgatcgat gaccgagaaa 300
 ctcttaggtc aatctgtgtg ttcatatata catcagtcca ataaatcgat cgttaattat 360
 attacaaagt tttcgcattt 380

<210> 12
 <211> 300
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 12
 ggccaaggcg atctatgact gaattgccaa tgcaccagcc tgtctacatg atgaataaat 60
 aaagagtcca tccagtgtga tggctcatgc ctgtgtgagt gtgactgaat ccatcagtgt 120
 gtgtgtgtgt ttgtgtcaac catgtgtgaa tcagggtgtca aaaatcgtgg ctggaaatcc 180
 atgtggtttc tagctttatg taaatgttgt ttgtgaaata taaatattgt tttgtgtatg 240
 tgaattttac tctctcattt ttctcttgca ctcaccattc tattatagta atttttttaa 300

<210> 13
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Oryza sativa*

<400> 13
 ctaggctact gtagctagct gtgcatgtat gtgggtgtgg tactaaaata attagtgttt 60
 tccttttgtt tggaagcata tgtgtgggtga ataaatgatg aactccgatg ttcctctcta 120
 taaatcttga tgattcgcta gctatccgta cgtcgttggt ctttgatttg atgatgagat 180
 tgaaaaatgg aatgtcatgc taaggagggt gcc 213

<210> 14
 <211> 1812
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mã hóa codon được thiết kế lại

<400> 14
 atggtcogtc ctgtagaaac cccaacccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
 ttcagtctggt atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcggt ggtgggaaaag cgcgttacaa 120
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180
 cgtaattatg cgggcaacgt ctgggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
 ggccagcgta tcgtgctgctg tttcgatgctg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccc 360
 tatgttattg ccgggaaaaag tgtacgtatc accgtttgtg tgaacaacga actgaactgg 420
 cagactatcc cgccgggaat ggtgattacc gacgaaaacg gcaagaaaaa gcagtcttac 480
 ttccatgatt tctttaacta tgccggaatc catcgacgct taatgctcta caccacgccg 540
 aacacctggg tggacgatat caccgtgggt acgcatgtcg cgcaagactg taaccacgctg 600
 tctgttgact ggcaggtggt ggccaatggt gatgtcagcg ttgaactgctg tgatgcggat 660
 caacaggtgg ttgcaactgg acaaggcact agcgggactt tgcaagtggg gaatccgcac 720
 ctctggcaac cgggtgaagg ttatctctat gaactgtgctg tcacagccaa aagccagaca 780
 gagtgtgata tctacccgct tcgctcgccg atccgggtcag tggcagtgaa gggcgaacag 840
 ttcttgatta accacaaaacc gttctacttt actggctttg gtcgtcatga agatgcggac 900
 ttgctgtgca aaggattcga taacgtgctg atgggtgcacg accacgcatt aatggactgg 960
 attggggcca actcctaccg tacctcgcat tacccttacg ctgaagagat gctcgactgg 1020
 gcagatgaac atggcatcgt ggtgattgat gaaactgctg ctgtcggctt taacctctct 1080
 ttaggcattg gtttcgaagc gggcaacaag ccgaaagaac tgtacagcga agaggcagtc 1140
 aacggggaaa ctcagcaagc gcacttacag gcgattaaag agctgatagc gcgtgacaaa 1200
 aaccacccaa gcgtgggtgat gtggagtatt gccaacgaac cggatacccg tccgcaagggt 1260
 gcacgggaat atttcgcgcc actggcggaa gcaacgcgta aactcgaccc gacgcgtccg 1320
 atcacctgct tcaatgtaat gttctgcgac gctcacaccg ataccatcag cgatctcttt 1380
 gatgtgctgt gcctgaaccg ttattacgga tggatgtcc aaagcggcga tttggaaacg 1440
 gcagagaagg tactggaaaa agaacttctg gcctggcagg agaaactgca tcagccgatt 1500
 atcatcaccg aatacggcgt ggatacgta gccgggctgc actcaatgta caccgacatg 1560
 tggagtgaag agtatcagtg tgcattggctg gatatgtatc accgcgtctt tgatcgctgc 1620
 agcgcgctcg tcggtgaaca ggtatggaat ttccgcgatt ttgcgacctc gcaaggcata 1680
 ttgcgcgttg gcggtaacaa gaaagggatc ttcactcgcg accgcaaacc gaagtcggcg 1740
 gctttttctg tgcaaaaacg ctggactggc atgaacttcg gtgaaaaacc gcagcagggg 1800
 ggcaacaat ga 1812

<210> 15
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Virut thể khảm súp lơ

<400> 15

ccgacccctac	ctgtcacttc	atcaaaagga	cagtagaaaa	ggaaggtggc	acctacaaat	60
gccatcattg	cgataaagga	aaggctatca	ttcaagatgc	ctctgccgac	agtgggtccca	120
aagatggacc	cccacccacg	aggagcatcg	tggaaaaaga	agacgttcca	accacgtctt	180
cāaagcaagt	ggattgatgt	gataacttcca	ctgacgtaag	ggatgacgca	caatcccact	240
atccttcgca	agacccttcc	tctatataag	gaagttcatt	tcatttggag	aggacacgct	300
gaaatcacca	gtctctctct	acaa				324

<210> 16

<211> 1399

<212> ADN

<213> *Oryza sativa*

<400> 16

tcgaggtcat	tcatatgctt	gagaagagag	tcgggatagt	ccaaaataaa	acaaaggtaa	60
gattacctgg	tcaaaagtga	aaacatcagt	taaaaggtgg	tataaagtaa	aatatcggtg	120
ataaaagggtg	gcccaaagtg	aaattttactc	ttttctacta	ttataaaaaat	tgaggatgtt	180
tttgtcggta	ctttgatacg	tcattttttgt	atgaattggg	ttttaagttt	attcgttttt	240
ggaaatgcat	atctgtattt	gagtcggggt	ttaagttcgt	ttgcttttgt	aaatacacag	300
ggattttgtat	aagaaatatc	tttagaaaaa	cccatatgct	aatttgacat	aattttttgag	360
aaaaatatat	attcaggcga	attctcacaa	tgaacaataa	taagattaaa	atagctttcc	420
cccgttgcag	cgcatgggta	ttttttctag	taaaaataaa	agataaactt	agactcaaaa	480
cattttacaaa	aacaacccct	aaagttccta	aagcccaaag	tgctatccac	gatccatagc	540
aagcccagcc	caacccaacc	caacccaacc	caccccagtc	cagccaactg	gacaatagtc	600
tcacaccccc	cccactatca	ccgtgagttg	tccgcacgca	ccgcacgtct	cgcagccaaa	660
aaaaaaaaaga	aagaaaaaaaa	agaaaaagaa	aaaacagcag	gtgggtccgg	gtcgtggggg	720
ccggaaacgc	gaggaggatc	gcgagccagc	gacgaggccg	gccctccctc	cgtttccaaa	780
gaaacgcccc	ccatcgccac	tatatacata	ccccccctc	tcctcccatc	cccccaaccc	840
taccaccacc	accaccacca	cctccacctc	ctccccctc	gctgccggac	gacgagctcc	900
tccccctcc	ccctccgccc	ccgcccgcgc	ggtaaccacc	ccgcccctct	cctctttctt	960
tctcogtttt	tttttccgtc	tcggtctcga	tctttggcct	tggtagtttg	ggtgggagag	1020
aggcggcttc	gtgcgcgccc	agatcggtgc	gcgggagggg	cgggatctcg	cggctggggc	1080
tctcgcgggc	gtggatccgg	cccggatctc	gcggggaatg	gggctctcgg	atgtagatct	1140
gcgatccgcc	gttgttgggg	gagatgatgg	ggggtttaaa	atttccgccc	tgctaaacaa	1200
gatcaggaag	aggggaaaag	ggcactatgg	tttatatttt	tatatatttc	tgctgcttcg	1260
tcaggcttag	atgtgctaga	tctttctttc	ttctttttgt	gggtagaatt	tgaatccctc	1320
agcattgttc	atcggtagtt	tttcttttca	tgattttgtg	caaatgcagc	ctcgtgcgga	1380
gcttttttgt	aggtagaag					1399