



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

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

(11)



1-0027752

(51)⁷ A01H 5/00

(13) B

(21) 1-2012-00710

(22) 18/08/2010

(86) PCT/US2010/045869 18/08/2010

(87) WO2011/022469 24/02/2011

(30) 61/235,248 19/08/2009 US

(45) 25/03/2021 396

(43) 27/08/2012 293A

(73) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 4268, United States of America

(72) CUI Yunxing Cory (US); BRYAN Jill (US); MAUM Donald (US); GILLES Greg (US); WRIGHT Terry (US); HAMILTON Jennifer; (US); ARNOLD Nicole (US); VANOPDORP Nathan (US); KAISER Tina (US); ZHOU Ning (CA).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CÂY NGÔ CHUYỂN GEN, CÂY CON CỦA CÂY NGÔ NÀY, HẠT NGÔ CHUYỂN GEN, POLYNUCLEOTIT, PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN BIẾN THỂ GEN NGÔ, KIT PHÁT HIỆN ADN VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ CỎ ĐẠI

(57) Sáng chế đề cập đến một phần quá trình nhân giống cây và cây chống chịu với thuốc diệt cỏ. Sáng chế cũng đề cập đến biến thể gen biến nạp AAD-1 mới ở cây ngô bao gồm trình tự polynucleotit, như được đề cập trong bản mô tả này, được cài xen vào vị trí đặc hiệu trong hệ gen của tế bào ngô. Theo một số phương án, gen/trình tự polynucleotit này có thể “kết hợp” với tính trạng khác bao gồm, ví dụ, các gen chống chịu thuốc diệt cỏ khác và/hoặc các protein ức chế côn trùng. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thử nghiệm phát hiện sự có mặt của gen theo sáng chế trong mẫu (của hạt ngô chẳng hạn). Phương pháp này có thể dựa vào trình tự ADN của cấu trúc tái tổ hợp, được cài xen vào hệ gen ngô, và trên trình tự hệ gen nằm ở sườn bên vị trí cài xen. Sáng chế cũng đề cập đến kit và các điều kiện có thể dùng để thực hiện thử nghiệm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến một phần quá trình nhân giống cây và cây chống chịu với thuốc diệt cỏ. Sáng chế cũng đề cập đến biến thể gen biến nạp AAD-1 mới ở cây ngô bao gồm trình tự polynucleotit, như được đề cập trong bản mô tả này, được cài xen vào vị trí đặc hiệu trong hệ gen của tế bào ngô. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến thử nghiệm phát hiện sự có mặt của gen theo sáng chế trong mẫu (của hạt ngô chẳng hạn). Phương pháp này có thể dựa vào trình tự ADN của cấu trúc tái tổ hợp, được cài xen vào hệ gen ngô, và trên trình tự hệ gen nằm ở sườn bên vị trí cài xen. Kit và các điều kiện có thể dùng để thực hiện thử nghiệm này cũng được đề cập.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Gen AAD-1 (có nguồn gốc từ *Sphingobium herbicidovorans*) mã hóa protein aryloxyalkanoat dioxygenaza (AAD-1). Nó có tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ axit 2,4-điclophenoxyaxetic và thuốc diệt cỏ aryloxyphenoxypionat (thường được gọi là thuốc diệt cỏ “fop” như quizalofop) và có thể được sử dụng làm gen đánh dấu chọn lọc trong quá trình biến nạp cây và trong nhân giống vườn ươm. Bản thân gen AAD-1, liên quan đến tính chống chịu thuốc diệt cỏ ở cây, đã được đề cập đầu tiên trong Công bố đơn quốc tế số WO 2005/107437 (và cả US 2009-0093366).

Sự biểu hiện của các gen dị tương đồng hoặc gen ngoại lai ở cây bị ảnh hưởng bởi vị trí gen ngoại lai được cài xen trong nhiễm sắc thể. Điều này có thể là do cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ, dị nhiễm sắc) hoặc mức độ gắn gũi của các yếu tố điều hòa phiên mã (ví dụ, các gen tăng cường) gần với vị trí xâm nhập (Weising và các đồng tác giả, *Ann. Rev. Genet* 22:421-477, 1988), chẳng hạn. Cùng một gen ở cùng một loại thực vật chuyển gen (hoặc sinh vật khác) có thể có biến đổi lớn về mức độ biểu hiện trong số các biến thể gen khác nhau. Cũng có thể có sự khác nhau về kiểu biểu hiện theo không gian hoặc thời gian. Ví dụ, sự khác nhau về sự biểu hiện tương đối của gen chuyển ở các mô cây khác nhau có thể không tương ứng với các kiểu mong đợi từ các yếu tố điều hòa phiên mã có mặt trong cấu trúc gen được đưa vào.

Do đó, một lượng lớn biến thể gen thường được tạo ra và sàng lọc để nhận diện một biến thể gen biểu hiện gen quan tâm được đưa vào đến mức độ thỏa đáng cho mục đích

định trước. Nhằm mục đích thương mại, người ta thường tạo ra từ hàng trăm đến hàng nghìn biến thể gen khác nhau và sàng lọc các biến thể gen này để thu được một biến thể gen có mức và kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn. Một biến thể gen có mức và/hoặc kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn có thể dùng để du nhập gen chuyển vào nền gen khác bằng cách lai chéo hữu tính sử dụng các phương pháp nhân giống thông thường. Thế hệ con của các phép lai như vậy vẫn giữ được các đặc điểm biểu hiện gen chuyển của thể biến nạp gốc. Cách thức này được sử dụng để đảm bảo sự biểu hiện gen chắc chắn ở một số biến thể gen thích nghi tốt với các điều kiện sinh trưởng của địa phương.

Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20020120964 A1 và 20040009504 A1 đề cập đến biến thể gen ngô PV-GHGT07(1445) và chế phẩm và phương pháp phát hiện chúng. Công bố đơn quốc tế số WO 02/100163 đề cập đến biến thể gen bông MONI5985 và chế phẩm và phương pháp phát hiện chúng. Công bố đơn quốc tế số WO 2004/011601 đề cập đến biến thể gen ngô MON863 và chế phẩm và phương pháp phát hiện chúng. Công bố đơn quốc tế số WO 2004/072235 đề cập đến biến thể gen bông MON 88913 và chế phẩm và phương pháp phát hiện chúng.

Công bố đơn quốc tế số WO 2006/098952 đề cập đến biến thể gen ngô 3272. Công bố đơn quốc tế số WO 2007/142840 đề cập đến biến thể gen ngô MIR162.

Patent Mỹ số 7,179,965 đề cập đến biến thể gen bông mang gen cry1F và cry1Ac.

Sáng chế đề cập đến biến thể gen ngô AAD-1 đặc biệt chưa từng được bộc lộ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất biến thể gen ngô AAD-1 được đặt tên DAS-40278-9 có hạt được lưu giữ trong Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC) với số truy nhập PTA-10244, và thế hệ con có nguồn gốc từ chúng. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thế hệ cây con, hạt hoặc các bộ phận có thể tái sinh của cây và hạt và thế hệ con của biến thể gen ngô DAS-40278-9, cũng như thực phẩm và thức ăn gia súc được chế biến từ chúng. Sáng chế cũng đề xuất các bộ phận của cây từ biến thể gen ngô DAS-40278-9 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phần hoa, noãn, hoa, chồi, rễ, và lá, và nhân của tế bào sinh dưỡng, tế bào phần hoa, và tế bào trứng. Sáng chế cũng đề xuất cây ngô có tính chống chịu thuốc diệt cỏ phenoxy auxinic và/hoặc aryloxyalkanoat, thành phần gen mới của biến thể gen ngô DAS-40278-9, và các khía cạnh về đặc tính nông học của cây ngô bao gồm biến thể gen ngô DAS-40278-9.

Sáng chế đề xuất một phần quá trình nhân giống cây và cây có tính chống chịu thuốc diệt cỏ. Sáng chế đề xuất biến thể gen biến nạp *aad-1* ở cây ngô bao gồm trình tự polynucleotit, như được đề cập trong bản mô tả này, được cài xen vào vị trí đặc hiệu trong hệ gen của tế bào ngô.

Theo một số phương án, gen/trình tự polynucleotit này có thể được “kết hợp” với tính trạng khác bao gồm, ví dụ, các gen chống chịu các thuốc diệt cỏ khác và/hoặc protein ức chế sâu bọ. Tuy nhiên, sáng chế còn đề xuất cây có một gen, như được đề cập trong bản mô tả này.

Tính trạng bổ sung có thể được kết hợp vào hệ gen cây nhờ quá trình nhân giống cây, biến nạp lại thực vật chuyển gen chứa biến thể gen ngô DAS-40278-9, hoặc bổ sung tính trạng mới thông qua quá trình xâm nhập hướng đích nhờ tái tổ hợp tương đồng.

Các phương án khác gồm quá trình cắt trình tự polynucleotit bao gồm biến thể gen ngô DAS-40278-9 bao gồm, ví dụ, catxet biểu hiện gen *pat*. Khi cắt trình tự polynucleotit, biến thể gen đã được cải biến có thể được hướng đích lại ở vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu trong đó trình tự polynucleotit bổ sung được kết hợp với biến thể gen ngô DAS-40278-9.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vị trí nhiễm sắc thể hướng đích của ngô nằm trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20cM giữa các gen đánh dấu SSR UMC1265 (xem SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31) và MMC0111 (xem SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33) ở khoảng 20cM trên bản đồ liên kết của ngô 2008 DAS, trong đó vị trí đích bao gồm axit nucleic dị tương đồng. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất vị trí nhiễm sắc thể hướng đích của ngô bao gồm vị trí được xác định trong hoặc bởi SEQ ID NO:29 và phần còn lại của chúng là như được đề cập trong bản mô tả này, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô chuyển gen bao gồm bước cài xen axit nucleic dị tương đồng ở vị trí trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20cM giữa các gen đánh dấu SSR UMC1265 (xem SEQ ID NO:30 và SEQ ID NO:31) và MMC0111 (xem SEQ ID NO:32 và SEQ ID NO:33) ở khoảng 20cM trên bản đồ liên kết của ngô 2008 DAS. Theo phương án khác nữa, axit nucleic dị tương đồng đã được cài xen là đầu 5' bị nằm ở sườn bên bởi toàn bộ hoặc một phần trình tự nằm ở sườn bên 5' như được xác định trong bản mô tả này liên quan đến SEQ ID NO:29, và đầu 3' bị nằm ở sườn bên bởi toàn bộ hoặc một phần trình tự nằm ở sườn bên 5' như được xác định trong bản mô tả này liên quan đến SEQ ID NO:29.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của gen theo sáng chế trong mẫu (của hạt ngô chẳng hạn). Các thử nghiệm này có thể dựa vào trình tự ADN của cấu trúc tái tổ hợp, được cài xen vào hệ gen của ngô, và trên trình tự hệ gen nằm ở sườn bên vị trí cài xen. Sáng chế cũng đề xuất kit và các điều kiện có thể dùng để thực hiện các thử nghiệm này.

Do đó, sáng chế đề xuất một phần quá trình tách dòng vô tính và phân tích trình tự ADN của đoạn cài xen *AAD-1* nguyên vẹn, và các vùng biên của chúng (ở các dòng ngô chuyển gen). Trình tự này là duy nhất. Dựa vào trình tự cài xen và trình tự biên này tạo ra đoạn môi đặc hiệu biến thể gen. Phân tích PCR đã chứng minh được rằng các biến thể gen này có thể được nhận diện nhờ phân tích sản phẩm khuếch đại PCR được tạo ra bằng các đoạn môi đặc hiệu biến thể gen này. Do đó, các quá trình liên quan này hoặc các quá trình liên quan khác có thể được sử dụng để nhận diện duy nhất các dòng ngô bao gồm biến thể gen ngô theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện bản đồ plasmit của pDAS1740.

Fig. 2 thể hiện các thành phần của đoạn cài xen với DAS-40278-9 (pDAS1740).

Fig. 3 thể hiện bản đồ giới hạn và các thành phần của đoạn cài xen với DAS-40278-9 (pDAS1740).

Fig. 4 thể hiện sản phẩm khuếch đại, đoạn môi, và quá trình tách dòng vô tính với đoạn cài xen ADN và vùng biên với DAS-40278-9.

Fig. 5 minh họa các vị trí đoạn môi đối với đoạn cài xen và vùng biên với DAS-40278-9.

Fig. 6 minh họa vùng nối và quá trình cài xen với DAS-40278-9.

Fig. 7 là sơ đồ nhân giống trong ví dụ 7.

Mô tả vắn tắt trình tự

Trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-28 là các đoạn môi như được đề cập trong bản mô tả này.

SEQ ID NO:29 thể hiện trình tự cài xen và trình tự nằm ở sườn bên đối với gen theo sáng chế DAS-40278-9.

Trình tự nêu trong SEQ ID NO:30-33 là đoạn môi cho các gen đánh dấu nằm ở sườn bên như được mô tả trong ví dụ 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất một phần quá trình nhân giống cây và cây có tính chống chịu thuốc diệt cỏ. Sáng chế đề xuất dạng biến nạp mới của cây ngô bao gồm trình tự polynucleotit *aad-1* theo sáng chế, như được đề cập trong bản mô tả này, được cài xen vào vị trí đặc hiệu trong hệ gen của tế bào ngô. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit này có thể được “kết hợp” với tính trạng khác (như các gen chống chịu thuốc diệt cỏ khác và/hoặc các gen mã hóa protein ức chế sâu bọ, chẳng hạn. Theo một số phương án, trình tự polynucleotit này có thể được cắt và được hướng đích lại sau đó với trình tự polynucleotit bổ sung. Tuy nhiên, sáng chế cũng đề xuất cây có một gen, như được đề cập trong bản mô tả này.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của gen theo sáng chế trong mẫu. Các khía cạnh của sáng chế đề xuất phương pháp thiết kế và/hoặc tạo ra các phân tử axit nucleic chẩn đoán bất kỳ được đưa ra làm ví dụ hoặc đề xuất trong bản mô tả này, cụ thể là các phương pháp dựa hoàn toàn hoặc một phần vào trình tự nằm ở sườn bên theo sáng chế.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất một phần biến thể gen ngô chuyển gen DAS-40278-9 (còn gọi là pDAS1740-278), các dòng cây bao gồm các biến thể gen này, và quá trình tách dòng vô tính và phân tích trình tự ADN của đoạn cài xen này, và/hoặc các vùng biên của chúng. Các dòng cây trồng theo sáng chế có thể được phát hiện bằng cách sử dụng trình tự được đề cập và đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các dòng ngô có tính chống chịu thuốc diệt cỏ, và việc nhận diện chúng. Sáng chế đề xuất một phần phương pháp phát hiện sự có mặt của biến thể gen theo sáng chế để xác định thế hệ con của quá trình lai hữu tính có chứa gen quan tâm hay không. Ngoài ra, phương pháp phát hiện gen trong thế hệ con và là hữu ích, ví dụ, để đáp ứng các quy định đối với chúng nhận trước khi đưa ra thị trường và đóng dấu kiểm định thực phẩm có nguồn gốc từ cây tái tổ hợp, chẳng hạn. Có thể phát hiện sự có mặt của gen theo sáng chế bằng phương pháp phát hiện axit nucleic đã biết bất kỳ như phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) hoặc phương pháp lai hóa ADN (DNA hybridization) bằng cách sử dụng đoạn môi axit nucleic. Một thử nghiệm RCR đặc hiệu gen được mô tả, ví dụ, bởi Windels và các đồng tác giả (Med. Fac. Landbouww, Univ. Gent 64/5b:459462, 1999). Tài liệu này đề cập đến việc nhận diện đậu tương có tính chống chịu glyphosat 40-3-2 bằng PCR sử dụng bộ đoạn môi

kéo dài phần nối giữa ADN cài xen và ADN nằm ở sườn bên. Cụ thể hơn, một đoạn mỗi chứa trình tự đoạn cài xen và đoạn mỗi thứ hai chứa trình tự từ ADN nằm ở sườn bên.

Ngô được cải biến nhờ quá trình cài xen gen *aad-1* của *Sphingobium herbicidovorans* mã hóa protein aryloxyalkanoat dioxygenaza (AAD-1). Tính trạng mang tính chống chịu axit 2,4-điclophenoxyaxetic và thuốc diệt cỏ aryloxyphenoxypionat (thông thường dùng để nói đến thuốc diệt cỏ “fop” như quizalofop) và có thể được sử dụng làm gen đánh dấu có thể chọn lọc trong quá trình biến nạp cây và trong nhân giống vườn ươm. Quá trình biến nạp ngô với đoạn ADN từ plasmit pDAS1740 được thực hiện thuận, qua nhân giống, để thu được biến thể gen DAS-40278-9.

Các mẫu ADN của hệ gen được chiết từ hai mươi cây ngô riêng rẽ có nguồn gốc từ năm thế hệ và bốn cây cho mỗi thế hệ của biến thể gen DAS-40278-9 được chọn lọc để xác định đặc điểm phân tử của biến thể gen ngô AAD-1 được đặt tên là DAS-40278-9. Sự biểu hiện của protein AAD-1 được thử nghiệm bằng cách sử dụng kit thử nghiệm nhanh đặc hiệu AAD-1. Chỉ có cây đã thử nghiệm dương tính với sự biểu hiện của protein AAD-1 được chọn lọc để xác định đặc điểm phân tử sau đó. Phép lai Southern đã khẳng định được rằng gen *aad-1* có mặt trong cây ngô đã thử nghiệm dương tính với sự biểu hiện của protein AAD-1, và gen *aad-1* được cài xen ở dạng một bản sao nguyên vẹn ở các cây này khi được lai với đầu phát hiện gen *aad-1*.

Việc xác định đặc điểm phân tử của ADN đã được cài xen ở biến thể gen ngô AAD-1 được đặt tên là DAS-40278-9 cũng được đề cập trong bản mô tả này. Biến thể gen này được tạo ra nhờ biến nạp Whiskers với đoạn Fsp I của plasmit pDAS1740. Phân tích thấm tách Southern được sử dụng để thiết lập kiểu xâm nhập của đoạn ADN đã được cài xen và xác định số lượng đoạn cài xen/số lượng bản sao của gen *aad-1* ở biến thể gen DAS-40278-9. Dữ liệu thu được chứng minh quá trình xâm nhập và tính nguyên vẹn của gen chuyển *aad-1* được cài xen vào hệ gen của ngô. Việc xác định đặc điểm của quá trình xâm nhập của các vùng không ghi mã (được thiết kế để điều hòa các vùng ghi mã), như trình tự khởi đầu và trình tự kết thúc, các vùng dính với chất nền RB7 Mar v3 và RB7 Mar v4, cũng như độ ổn định của đoạn cài xen gen chuyển qua các thế hệ, được đánh giá. Độ ổn định của ADN đã được cài xen được chứng minh qua năm thế hệ cây riêng biệt. Hơn nữa, việc không có mặt của trình tự khung chính plasmit biến nạp gồm vùng gen chống chịu Ampixilin (*Ap^r*) được chứng minh bằng các đầu phát hiện phủ gần như nguyên vẹn

vùng khung chính nằm ở sườn bên các vị trí giới hạn (*Fsp* I) của plasmid pDAS1740. Bản đồ vật lý chi tiết về việc cài xen được vẽ dựa vào các phân tích thẩm tách Southern về biến thể gen DAS-40278-9 này.

Mức protein AAD-1 được xác định trong mô của ngô. Ngoài ra, việc phân tích thành phần được thực hiện trên vỏ bắp và hạt ngô để kiểm tra tính tương đương giữa dòng ngô không được biến nạp cùng dòng và dòng ngô chuyển gen DAS-40278-9 (không được phun, được phun bằng 2,4-D, được phun bằng quizalofop, và được phun bằng 2,4-D và quizalofop). Các đặc điểm nông học của dòng ngô không được biến nạp cùng dòng cũng được so sánh với ngô DAS-40278-9.

Biểu hiện cánh đồng, thành phần dinh dưỡng, và các thử nghiệm nông học của dòng ngô lai và đối chứng không chuyển gen và dòng ngô lai chứa aryloxyalkanoat dioxygenaza-1 (AAD-1) được thực hiện trong cùng một năm ở sáu vị trí được đặt ở Iowa, Illinois (2 vị trí), Indiana, Nebraska và Ontario, Canada. Mức độ biểu hiện được tóm tắt trong bản mô tả này về mức protein AAD-1 ở lá, phần hoa, rễ, vỏ bắp, cây nguyên vẹn, và hạt, kết quả của các xác định nông học, và phân tích thành phần của các mẫu vỏ bắp và hạt từ ngô đối chứng và ngô DAS-40278-9 AAD-1.

Protein AAD-1 có thể chiết, hòa tan được đo bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) định lượng ở lá, phần hoa, rễ, vỏ bắp, cây nguyên vẹn, và hạt ngô. Quan sát được các giá trị biểu hiện trung bình tốt ở rễ và mô phần hoa, như được đề cập chi tiết hơn trong bản mô tả này. Các giá trị biểu hiện là tương tự ở tất cả các xử lý đã được phun cũng như đối với các khu vực được phun và không được phun thuốc diệt cỏ 2,4-D và quizalofop.

Các phân tích thành phần, gồm mức gần gũi, chất khoáng, axit amin, axit béo, vitamin, chất kháng dinh dưỡng, và các chất chuyển hóa thứ cấp được thực hiện để kiểm tra mức độ tương đương của ngô DAS-40278-9 AAD-1 (có hoặc không có xử lý bằng thuốc diệt cỏ) với mẫu đối chứng. Các kết quả đối với mẫu chế phẩm DAS-40278-9 AAD-1 đều tốt như nhau, hoặc tốt hơn (về mặt sinh học và nông nghiệp), so với các dòng đối chứng và/hoặc ngô thông thường, phân tích dữ liệu nông nghiệp thu được từ sơ đồ đối chứng và sơ đồ ngô DAS-40278-9 AAD-1.

Như được đề cập trên đây trong phần Bản chất kỹ thuật của sáng chế, việc đưa vào và xâm nhập gen chuyển vào hệ gen cây liên quan đến một số gen ngẫu nhiên (do đó “gen” dùng cho đoạn cài xen được biểu hiện đã chọn). Nghĩa là, với nhiều kỹ thuật biến

nap như biến nạp *Agrobacterium*, “súng gen”, và WHISKERS, không thể dự đoán được địa điểm nào trong hệ gen mà gen chuyển sẽ được cài xen vào. Do vậy, việc nhận diện ADN hệ gen cây nằm ở sườn bên ở cả hai phía của đoạn cài xen có thể là quan trọng để nhận diện cây có gen cài xen đã chọn. Ví dụ, các đoạn môi PCR có thể được thiết kế để tạo ra sản phẩm khuếch đại PCR qua vùng nối của đoạn cài xen và hệ gen vật chủ. Sản phẩm khuếch đại PCR này có thể được sử dụng để xác định dạng duy nhất và riêng biệt của gen cài xen.

“Biến thể gen” là các biến thể gen ngẫu nhiên ban đầu, là một phần của sáng chế, là ít nhất 2500 hạt của dòng ngô bao gồm biến thể gen đã được lưu giữ và có thể bộc lộ công khai không giới hạn (trừ đối tượng có quyền sử dụng sáng chế), trong Bộ sưu tập giống chuẩn của Mỹ (American Type Culture Collection - ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110. Mẫu lưu giữ này đã được định danh với số hiệu lưu giữ ATCC Là PTA-10244 (Hạt ngô lai có đốm vàng (*Zea mays* L.):DAS-40278-9; được lưu giữ đại diện cho Dow AgroSciences LLC; Ngày ATTC tiếp nhận hạt/chủng: 10 tháng 07 năm 2009; khả năng sống được xác nhận ngày 17 tháng 08 năm 2009). Việc lưu giữ này được thực hiện và sẽ được duy trì phù hợp với và theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest về lưu giữ hạt giống nhằm tiến hành các thủ tục về patent. Việc lưu giữ là công khai, sẽ được duy trì mà không chỉ giới hạn ở việc lưu giữ tại ATCC, trong khoảng thời gian 30 năm, hoặc năm năm tính từ thời gian yêu cầu gần nhất, hoặc trong thời gian hiệu lực của patent, tùy theo cái nào lâu hơn, và sẽ được thay thế nếu nó không còn sống trong khoảng thời gian đó.

Hạt đã được lưu giữ là một phần của sáng chế. Rõ ràng là, cây ngô có thể được sinh trưởng từ các hạt này, và các cây này là một phần của sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất trình tự ADN chứa trong các cây ngô này có thể dùng để phát hiện các cây này và thế hệ con của chúng. Phương pháp phát hiện và kit theo sáng chế có thể dùng để xác định một, hai, hoặc thậm chí tất cả ba biến thể gen trong số các biến thể gen này, tùy thuộc vào mục đích cuối cùng của thử nghiệm.

Định nghĩa và các ví dụ được nêu trong bản mô tả này nhằm giúp mô tả sáng chế và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này ứng dụng thực tế sáng chế. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan. Danh pháp của các bazơ ADN như được nêu trong 37 CFR Đ1.822 được sử dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thế hệ con" để chỉ con của thế hệ bất kỳ của cây bố mẹ bao gồm AAD-1 biến thể gen ngô DAS-40278-9.

"Biến thể gen" chuyển gen được tạo ra nhờ biến nạp các tế bào cây với ADN dị tương đồng, tức là, cấu trúc axit nucleic gồm gen chuyển đang quan tâm, tái sinh quần thể cây thu được từ việc cài xen gen chuyển vào hệ gen của cây, và chọn lọc cây cụ thể khác biệt ở chỗ có cài xen vào vị trí hệ gen cụ thể. Thuật ngữ "biến thể gen" dùng để chỉ thể biến nạp gốc và thế hệ con của thể biến nạp này gồm ADN dị tương đồng. Thuật ngữ "biến thể gen" cũng dùng để chỉ thế hệ con được tạo ra bằng cách lai chéo hữu tính giữa thể biến nạp này và biến thể gen khác gồm ADN hệ gen/ADN gen chuyển. Thậm chí sau khi lặp lại việc lai ngược với bố mẹ tái diễn theo định kỳ, ADN gen chuyển đã được cài xen và ADN hệ gen nằm ở sườn bên (ADN hệ gen/ADN gen chuyển) từ bố mẹ đã được biến nạp có mặt trong thế hệ con lai ở cùng vị trí nhiễm sắc thể. Thuật ngữ "biến thể gen" cũng dùng để chỉ ADN từ thể biến nạp gốc và thế hệ con của chúng bao gồm ADN đã được cài xen và trình tự hệ gen nằm ở sườn bên ngay sát với ADN đã được cài xen mà dự định được chuyển vào thế hệ con tiếp nhận ADN đã được cài xen gồm gen chuyển đang quan tâm thu được từ phép lai hữu tính một dòng bố mẹ gồm ADN đã được cài xen (ví dụ, thể biến nạp gốc và thế hệ con thu được từ quá trình tự phối) và dòng bố mẹ không chứa ADN đã được cài xen.

"Trình tự nối" kéo dài điểm mà tại đó ADN được cài xen vào hệ gen được liên kết với ADN từ hệ gen tự nhiên của ngô nằm ở sườn bên điểm cài xen, việc nhận diện hoặc phát hiện một hoặc trình tự nối khác trong vật liệu di truyền của cây là đủ để chẩn đoán gen. Trình tự ADN kéo dài các đoạn cài xen ở biến thể gen ngô đã được đề cập trong bản mô tả này và có chiều dài tương tự với ADN nằm ở sườn bên. Các ví dụ cụ thể về trình tự chẩn đoán như vậy được đề xuất trong bản mô tả này; tuy nhiên, trình tự khác chồng lợp lên các phần nối của các đoạn cài xen, hoặc các phần nối của các đoạn cài xen và trình tự hệ gen, cũng chẩn đoán và có thể được sử dụng theo sáng chế.

Sáng chế đề xuất việc nhận diện trình tự nằm ở sườn bên, trình tự nối, và trình tự cài xen này. Các đoạn môi PCR và sản phẩm khuếch đại liên quan nằm trong phạm vi của sáng chế. Theo sáng chế, các phương pháp phân tích PCR sử dụng sản phẩm khuếch đại kéo dài ADN lai đã được cài xen và các biên của nó có thể được sử dụng để phát hiện và nhận diện biến thể gen ngô chuyển gen bán trên thị trường hoặc dòng ngô có nguồn gốc từ các dòng ngô chuyển gen đã được đăng ký độc quyền.

Toàn bộ các trình tự của mỗi đoạn cài xen này, cùng với các phần trình tự nằm ở sườn bên tương ứng, được đề xuất trong bản mô tả này là trình tự nêu trong SEQ ID NO:29. Việc phối hợp trình tự cài xen và trình tự nằm ở sườn bên cho gen này liên quan đến trình tự nêu trong SEQ ID NO:29 (tổng số 8557 cặp bazơ) được in dưới đây. Việc phối hợp này được mô tả một cách chi tiết hơn trong ví dụ 3.8 chẳng hạn.

	Nằm ở sườn bên đầu 5'	Đoạn cài xen	Nằm ở sườn bên đầu 3'
Gốc #s (SEQ:29):	1-1873	1874-6689	6690-8557
Chiều dài (bp):	1873 bp	4816 bp	1868 bp

Đoạn cài xen này, và các thành phần khác nữa của chúng, được minh họa tiếp trên các Fig. 1 và 2. Trình tự này (cụ thể là trình tự nằm ở sườn bên) là duy nhất. Dựa vào trình tự cài xen và trình tự biên này, đoạn mỗi đặc hiệu gen được tạo ra. Phân tích PCR đã chứng minh được rằng các dòng ngô này có thể được nhận diện ở các kiểu gen ngô khác nhau nhờ phân tích sản phẩm khuếch đại PCR được tạo ra bằng nhóm đoạn mỗi đặc hiệu gen này. Do vậy, các phương pháp này và các phương pháp liên quan khác có thể được sử dụng để nhận diện duy nhất các dòng ngô này. Trình tự được nhận diện trong bản mô tả này là duy nhất. Ví dụ, BLAST tra cứu trên cơ sở dữ liệu GENBANK đã không phát hiện ra sự tương đồng đáng kể bất kỳ giữa trình tự biên đã được tách dòng vô tính và trình tự trong cơ sở dữ liệu.

Kỹ thuật phát hiện theo sáng chế đặc biệt hữu ích kết hợp với quá trình nhân giống cây, để xác định thế hệ cây con bao gồm gen đã chọn, sau khi cây bố mẹ bao gồm một gen quan tâm được lai với dòng cây khác để nhằm tạo ra một hoặc nhiều tính trạng bổ sung quan tâm ở thế hệ con. Các phương pháp phân tích PCR này làm lợi cho chương trình nhân giống ngô cũng như kiểm soát chất lượng, đặc biệt là đối với hạt ngô chuyển gen bán trên thị trường. Kit phát hiện PCR cho các dòng ngô chuyển gen này cũng có thể được tạo ra và sử dụng. Điều này cũng có thể làm lợi cho việc đăng ký sản phẩm và quản lý sản phẩm.

Hơn nữa, trình tự ngô nằm ở sườn bên/trình tự hệ gen có thể được sử dụng để nhận diện một cách đặc hiệu vị trí hệ gen của mỗi đoạn cài xen. Thông tin này có thể được sử dụng để tạo ra hệ gen đánh dấu phân tử đặc hiệu với mỗi gen. Các hệ gen này có thể được sử dụng để đẩy nhanh quá trình nhân giống và thiết lập dữ liệu liên kết.

Ngoài ra, thông tin về trình tự nằm ở sườn bên có thể được sử dụng để nghiên cứu và xác định đặc điểm các quá trình xâm nhập gen chuyển, các đặc tính vị trí xâm nhập hệ

gen, sàng lọc gen, độ ổn định của các gen chuyển và trình tự nằm ở sườn bên của chúng, và sự biểu hiện gen (nhất là liên quan đến bất hoạt gen, kiểu metyl hóa gen chuyển, hiệu ứng vị trí, và các yếu tố liên quan đến khả năng biểu hiện như MARS [các vùng dính với chất nền], và các đặc điểm tương tự).

Từ toàn bộ phần mô tả theo sáng chế thấy rõ rằng sáng chế đề xuất hạt được lưu giữ với số hiệu lưu giữ ATCC là PTA-10244. Sáng chế cũng đề xuất ngô có tính chống chịu thuốc diệt cỏ sinh trưởng từ hạt được lưu giữ tại ATCC với số truy nhập là PTA-10244. Sáng chế còn đề xuất các bộ phận của cây này như lá, mẫu mô, hạt được tạo ra từ cây này, phần hoa, và các bộ phận tương tự.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất thế hệ con và/hoặc thế hệ cây con của cây sinh trưởng từ hạt đã được lưu giữ, tốt hơn là ngô có tính chống chịu thuốc diệt cỏ trong đó cây này có hệ gen bao gồm ADN hệ gen kiểu dại có thể phát hiện được/trình tự nối ADN cài xen như được đề cập trong bản mô tả này. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngô” nghĩa là ngô hạt (*Zea mays*) và bao gồm tất cả các biến thể gen của chúng có thể được nhân giống với ngô.

Sáng chế còn đề xuất quy trình lai chéo bằng cách sử dụng cây trồng theo sáng chế làm ít nhất một bố mẹ. Ví dụ, sáng chế đề xuất cây lai F_1 có một hoặc cả hai bố mẹ bất kỳ trong số các cây được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này. Sáng chế cũng bao gồm hạt được tạo ra bởi các thế hệ lai F_1 này theo sáng chế. Sáng chế đề xuất phương pháp tạo hạt lai F_1 bằng cách lai chéo cây được lấy làm ví dụ với cây khác nhau (ví dụ, bố mẹ trong nhân giống) và thu hoạch hạt lai thu được. Sáng chế đề xuất cây được lấy làm ví dụ là biến thể gen cái hoặc biến thể gen đực. Các đặc tính cây thu được có thể được cải thiện nhờ xem xét một cách cẩn thận cây bố mẹ.

Cây ngô có tính chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được nhân giống bằng cách lai chéo hữu tính trước tiên cây ngô bố mẹ thứ nhất gồm cây ngô sinh trưởng từ hạt của dòng bất kỳ trong số các dòng được đề cập trong bản mô tả này, và cây ngô bố mẹ thứ hai, nhờ đó tạo ra vô số thế hệ cây con thứ nhất; và tiếp theo chọn lọc thế hệ cây con thứ nhất có chống chịu thuốc diệt cỏ (hoặc có ít nhất một trong số tính trạng theo sáng chế); và tự phối thế hệ cây con thứ nhất, nhờ đó tạo ra vô số thế hệ cây con thứ hai; và tiếp theo chọn lọc từ thế hệ cây con thứ hai các cây có chống chịu thuốc diệt cỏ (hoặc có ít nhất một trong số các gen theo sáng chế). Các bước này có thể còn bao gồm việc lai ngược thế hệ cây con thứ nhất hoặc thế hệ cây con thứ hai với cây ngô bố mẹ thứ hai hoặc cây ngô bố mẹ thứ ba. Ngô bao gồm ngô hạt theo sáng chế, hoặc thế hệ con của chúng, tiếp đó có thể được trồng.

Cũng cần hiểu rằng hai thực vật chuyển gen khác nhau cũng có thể được giao phối để tạo ra thế hệ con chứa hai gen ngoại sinh được bổ sung cách ly một cách độc lập. Quá trình tự phối thế hệ con thích hợp có thể tạo ra cây là đồng hợp tử cho cả hai gen ngoại sinh bổ sung. Lai ngược với cây bố mẹ và lai chéo với cây không chuyển gen cũng được dự tính, là sinh sản sinh dưỡng. Các phương pháp nhân giống khác thường được sử dụng cho tính trạng khác nhau và cây trồng đã biết trong lĩnh vực này. Quá trình nhân giống lai chéo ngược đã được sử dụng để truyền các gen cho tính trạng được kế thừa hoàn toàn, tính trạng có thể kế thừa ở mức cao vào cây trồng đồng hợp tử mong muốn hoặc dòng lai cùng dòng, là bố mẹ tái diễn theo định kỳ. Nguồn tính trạng được truyền được gọi là bố mẹ thể cho. Cây thu được dự định có đặc tính của bố mẹ tái diễn theo định kỳ (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được truyền từ bố mẹ thể cho. Sau khi lai ban đầu, các cá thể có phenotyp của bố mẹ thể cho được chọn và được lai lặp lại (lai chéo ngược) với bố mẹ tái diễn theo định kỳ. Bố mẹ thu được dự định có đặc tính của bố mẹ tái diễn theo định kỳ (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được truyền từ bố mẹ thể cho.

Phân tử ADN theo sáng chế có thể được sử dụng làm gen đánh dấu phân tử trong phương pháp nhân giống dựa vào gen đánh dấu (MAB). Phân tử ADN theo sáng chế có thể được sử dụng trong các phương pháp (như gen đánh dấu AFLP, gen đánh dấu RFLP, gen đánh dấu RAPD, SNP, và SSR) nhận diện tính trạng hữu ích trong nông nghiệp có liên kết về mặt di truyền, như đã biết trong lĩnh vực này. Tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được lựa chọn ở thế hệ con của dòng lai với cây ngô theo sáng chế (hoặc thế hệ con của chúng và cây trồng hoặc biến thể gen ngô khác bất kỳ) bằng cách sử dụng MAB. Phân tử ADN là gen đánh dấu cho tính trạng này, và phương pháp MAB đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để lựa chọn tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ ở cây ngô trong đó ít nhất một dòng ngô theo sáng chế, hoặc thế hệ con của chúng, là bố mẹ hoặc ông bà. Các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để xác định biến thể gen ngô bất kỳ có gen theo sáng chế.

Các phương pháp theo sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô có tính chống chịu thuốc diệt cỏ, trong đó phương pháp này bao gồm việc nhân giống với cây trồng theo sáng chế. Đặc biệt hơn, các phương pháp này có thể bao gồm lai hai cây trồng theo sáng chế, hoặc một cây trồng theo sáng chế và cây trồng khác bất kỳ. Phương pháp được ưu tiên còn bao gồm việc chọn lọc thế hệ con của quá trình lai này bằng cách phân tích thế hệ con này về một gen có thể phát hiện theo sáng chế. Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể

được sử dụng để lựa chọn gen theo sáng chế qua chu trình nhân giống với các cây có tính trạng mong muốn khác như tính trạng hữu ích trong nông nghiệp như tính trạng được thử nghiệm trong bản mô tả này trong các ví dụ khác nhau. Các cây bao gồm các gen và tính trạng mong muốn có thể được phát hiện, nhận diện, được chọn, và được sử dụng nhanh trong các vòng nhân giống tiếp theo chẳng hạn. Gen theo sáng chế/tính trạng theo sáng chế cũng có thể được kết hợp qua quá trình nhân giống, và được lựa chọn theo sáng chế, với tính trạng có tính kháng côn trùng và/hoặc với tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ khác nữa. Một phương án được ưu tiên với tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ khác nữa là cây trồng chứa gen theo sáng chế kết hợp với gen mã hóa tính chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba.

Do vậy, sáng chế có thể được kết hợp với, ví dụ, tính trạng mã hóa tính chống chịu glyphosat (ví dụ, cây có tính chống chịu hoặc vi khuẩn *EPSPS*, *GOX*, *GAT*), tính chống chịu glufosinat (ví dụ, *Pat*, *bar*), tính chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế acetolactat syntaza (ALS) (ví dụ, imidazolinon [như imazetapyr], sulfonyleure, triazolopyrimidin sulfonanilic, pyrimidinylthiobenzoat, và các hóa chất khác [*CsrI*, *SurA*, và các đồng tác giả]), tính chống chịu bromxynil (ví dụ, *Bxn*), tính chống chịu chất ức chế HPPD (4-hydroxyphenyl-pyruvat-đioxyaza) enzym, tính chống chịu chất ức chế phytoen desaturaza (PDS), tính chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế quang hệ II (ví dụ, *psbA*), tính chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế quang hệ I, tính chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza IX (PPO) (ví dụ, *PPO-1*), tính chống chịu thuốc diệt cỏ độ phenylure (ví dụ, *CYP76B1*), enzym gây suy biến dicamba (xem, ví dụ, US 20030135879), và tính trạng khác có thể được kết hợp một mình hoặc ở nhiều dạng kết hợp để tạo ra khả năng để kiểm soát hoặc ngăn ngừa một cách hiệu quả sự luân phiên của cỏ dại và/hoặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ bất kỳ thuộc các nhóm trên đây.

Liên quan đến các thuốc diệt cỏ bổ sung, một số chất ức chế ALS (còn gọi là AHAS) bổ sung được ưu tiên bao gồm triazolopyrimidin sulfonanilic (như cloransulam-metyl, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, và penoxsulam), pyrimidinylthiobenzoats (như bispyribac và pyriithiobac), và flucarbazon. Một số chất ức chế HPPD được ưu tiên bao gồm mesotrion, isoxaflutol, và sulcotrion. Một số chất ức chế PPO được ưu tiên bao gồm flumiclorac, flumioxazin, flufenpyr, pyraflufen, fluthiaket,

butafenaxil, carfentrazon, sulfentrazon, và diphenylete (như axiflofen, fomesafen, lactofen, và oxyfluorfen).

Ngoài ra, *AAD-I* một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tính trạng HTC bổ sung có thể được kết hợp với một hoặc nhiều tính trạng đầu vào bổ sung (ví dụ, tính chống chịu côn trùng, tính chống chịu nấm, hoặc tính chống chịu ứng suất, v.v) hoặc tính trạng đầu ra (ví dụ, hiệu suất tăng, profin đầu được cải thiện, chất lượng sợi được cải thiện, v.v). Do vậy, phương pháp sáng chế có thể được sử dụng để thu được nhóm các đặc tính nông học có chất lượng cây tăng với khả năng phòng trừ một cách linh hoạt và hiệu quả về chi phí các loài gây hại bất kỳ trong nông nghiệp.

Phương pháp xâm nhập trình tự polynucleotit vào trong vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu của tế bào cây qua tái tổ hợp tương đồng đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, quá trình xâm nhập đặc hiệu vị trí như được mô tả trong Công bố đơn patent Mỹ số 2009/0111188 A1 mô tả việc sử dụng recombinaza hoặc integraza để làm trung gian việc đưa thể cho trình tự polynucleotit vào nhiễm sắc thể đích. Ngoài ra, Công bố đơn quốc tế số WO 2008/021207 mô tả quá trình tái tổ hợp tương đồng qua trung gian protein ngón tay kẽm để xâm nhập một hoặc nhiều trình tự polynucleotit thể cho trong các vị trí đặc hiệu của hệ gen. Việc sử dụng các recombinaza như FLP/FRT như được mô tả trong patent Mỹ số 6720475 hoặc CRE/LOX như được mô tả trong patent Mỹ số 5658772 có thể được sử dụng để xâm nhập trình tự polynucleotit vào trong vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu. Cuối cùng, việc sử dụng các meganucleaza để hướng các polynucleotit thể cho vào trong vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu được mô tả trong Puchta và các đồng tác giả, PNAS USA 93 (1996), các trang 5055-5060.

Các phương pháp xâm nhập đặc hiệu vị trí khác nhau vào trong các tế bào cây là đã biết và có thể ứng dụng thông thường (Kumar và các đồng tác giả, Trends in Plant Sci. 6(4) (2001) trang 155-159). Hơn nữa, hệ tái tổ hợp đặc hiệu vị trí đã được nhận diện ở một vài sinh vật chưa có nhân điển hình và sinh vật có nhân điển hình bậc thấp có thể được áp dụng để sử dụng ở cây. Ví dụ về các hệ như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: hệ R/RS recombinaza từ plasmit pSR1 của nấm *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki và các đồng tác giả (1985) J. Mol. Biol. 182: 191-203), và hệ Gin/gix của thể thực khuẩn Mu (Maeser và Kahlmann (1991) Mol. Gen. Genet. 230: 170-176).

Theo một số phương án theo sáng chế, có thể mong muốn xâm nhập hoặc kết hợp các gen chuyển mới gần với gen chuyển đang tồn tại. Gen chuyển có thể được xem là locut

hệ gen được ưu tiên đã được chọn dựa vào các đặc tính duy nhất như một vị trí cài xen, sự phân ly Mendel bình thường và sự biểu hiện một cách ổn định, và sự kết hợp cực hiệu quả, bao gồm đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ và các đặc tính nông học trong và qua nhiều vị trí trong môi trường. Các gen chuyển đã được xâm nhập mới phải duy trì các đặc tính biểu hiện gen chuyển của thể biến nạp đang tồn tại. Ngoài ra, việc phát triển các thử nghiệm để phát hiện và xác nhận về gen đã được xâm nhập mới sẽ thực hiện được vì trình tự nằm ở sườn bên hệ gen và vị trí nhiễm sắc thể của gen đã được xâm nhập mới đã được nhận diện. Cuối cùng, quá trình xâm nhập của gen chuyển mới vào trong vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu được liên kết với gen chuyển đang tồn tại sẽ thực hiện lai nhập gen của gen chuyển vào các nền di truyền khác bằng lai chéo hữu tính bằng cách sử dụng các phương pháp nhân giống thông thường.

Theo một số phương án theo sáng chế, có thể mong muốn cắt trình tự polynucleotit từ gen chuyển. Ví dụ, quá trình cắt gen chuyển như được mô tả trong đơn patent Mỹ số 61/297,628 đề cập đến việc sử dụng các nucleaza protein ngón tay kềm để loại bỏ trình tự polynucleotit, chứa cắt-xét biểu hiện gen, từ gen chuyển đã được xâm nhập nhiễm sắc thể. Trình tự polynucleotit được loại bỏ có thể là gen đánh dấu có thể chọn lọc. Khi cắt và loại bỏ trình tự polynucleotit gen chuyển đã được cải biến có thể được hướng đích lại nhờ đoạn cài xen của trình tự polynucleotit. Quá trình cắt trình tự polynucleotit và hướng đích lại sau đó gen chuyển đã được cải biến thu được các lợi ích như sử dụng lại gen đánh dấu có thể chọn lọc hoặc khả năng khắc phục các thay đổi ngoài dự kiến với hệ sản phẩm phiên mã cây tạo ra từ sự biểu hiện của các gen đặc hiệu.

Sáng chế đề xuất trong bản mô tả này vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể 2 ở hệ gen của ngô là mỹ mãn cho quá trình cài xen của các axit nucleic dị tương đồng. Sáng chế cũng đề xuất gen đánh dấu phân tử 5', gen đánh dấu phân tử 3', trình tự nằm ở sườn bên 5', và trình tự nằm ở sườn bên 3' có thể dùng để nhận diện sự định vị của vị trí đích trên nhiễm sắc thể 2. Do vậy, sáng chế đề xuất phương pháp đưa các axit nucleic dị tương đồng quan tâm vào vị trí đích đã được thiết lập trước này hoặc ở vùng lân cận của vị trí đích này. Sáng chế cũng đề xuất hạt ngô và/hoặc cây ngô bao gồm trình tự nucleotit dị tương đồng bất kỳ được cài xen ở vị trí đích đã được đề cập hoặc ở vùng lân cận chung của vị trí này. Một lựa chọn để đạt được việc xâm nhập hướng đích này là cắt và/hoặc thay thế đoạn cài xen khác nhau thay vào chỗ cắt-xét biểu hiện pat được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này. Thông

thường, về mặt này, tái tổ hợp tương đồng hướng đích, ví dụ và không giới hạn phạm vi của sáng chế, có thể được sử dụng theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, việc "kết hợp" gen, biến thể gen hoặc tính trạng là việc kết hợp tính trạng mong muốn vào một dòng chuyển gen. Các nhà nhân giống cây kết hợp tính trạng chuyển gen bằng cách thực hiện lai chéo giữa các bố mẹ có tính trạng mong muốn và tiếp theo nhận diện thế hệ con có cả tính trạng mong muốn của bố mẹ. Một cách khác để kết hợp gen là nhờ biến nạp hai hoặc nhiều gen vào nhân tế bào của cây đồng thời trong suốt quá trình biến nạp. Một cách khác để kết hợp gen là nhờ biến nạp lại thực vật chuyển gen với gen khác quan tâm. Ví dụ, kết hợp gen có thể được sử dụng để kết hợp hai hoặc nhiều tính trạng khác nhau bao gồm, ví dụ, hai hoặc nhiều khác nhau tính trạng côn trùng, tính trạng chống chịu với côn trùng và tính trạng chống chịu với bệnh, hai hoặc nhiều tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ, và/hoặc tính trạng chống chịu với côn trùng và tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ. Việc sử dụng gen đánh dấu có thể chọn lọc ngoài gen quan tâm cũng có thể là việc kết hợp gen đang xem xét.

“Tái tổ hợp tương đồng” dùng để chỉ phản ứng giữa cặp trình tự nucleotit bất kỳ có các vị trí tương ứng chứa trình tự nucleotit tương tự qua đó hai trình tự nucleotit có thể tương tác (tái tổ hợp) để tạo ra trình tự ADN tái tổ hợp mới. Mỗi vị trí của trình tự nucleotit tương tự được đề cập trong bản mô tả này là “trình tự tương đồng”. Nói chung, tần suất tái tổ hợp tương đồng tăng khi độ dài của trình tự tương đồng tăng. Do vậy, mặc dù tái tổ hợp tương đồng có thể xảy ra giữa hai trình tự nucleotit có mức đồng nhất thấp hơn, tần suất tái tổ hợp (hoặc hiệu suất) giảm vì sự phân hướng giữa hai trình tự tăng. Sự tái tổ hợp có thể đạt được bằng cách sử dụng một trình tự tương đồng trên mỗi thể cho và phân tử đích, nhờ đó tạo ra sản phẩm tái tổ hợp “lai chéo đơn”. Theo cách khác, hai trình tự tương đồng có thể được thay vào trên mỗi trình tự của đích và trình tự nucleotit thể cho. Sự tái tổ hợp giữa hai trình tự tương đồng trên thể cho với hai trình tự tương đồng trên đích tạo ra sản phẩm tái tổ hợp “lai chéo kép”. Nếu trình tự tương đồng trên phân tử thể cho trình tự nằm ở sườn bên được thao tác (ví dụ, trình tự quan tâm), sự tái tổ hợp lai chéo kép với phân tử đích sẽ dẫn đến sản phẩm tái tổ hợp trong đó trình tự quan tâm thay thế trình tự ADN ban đầu giữa trình tự tương đồng trên phân tử đích. Sự trao đổi trình tự ADN giữa đích và thể cho qua tái tổ hợp lai chéo kép được gọi là “sự thay thế trình tự”.

Enzym AAD-1 theo sáng chế có thể biểu hiện chuyển gen dẫn đến tính chống chịu sự kết hợp của các thuốc diệt cỏ có thể phòng trừ gần như toàn bộ cây lá rụng và cỏ dại.

AAD-1 có thể dùng làm chủng cây trồng có tính chống chịu thuốc diệt cỏ (HTC) mỹ mãn để kết hợp với tính trạng HTC khác (ví dụ, tính chống chịu glyphosat, tính chống chịu glufosinat, tính chống chịu imidazolinon, tính chống chịu bromxynil, v.v.), và tính trạng chống chịu với côn trùng (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry 34/45*, v.v.), chẳng hạn. Ngoài ra, *AAD-1* có thể dùng làm gen đánh dấu có thể chọn lọc để nhằm chọn lọc quá trình biến nạp cơ sở cây được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền với gen thứ hai của nhóm gen.

Tính trạng HTC theo sáng chế có thể được sử dụng trong tổ hợp mới với tính trạng HTC khác (bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính chống chịu glyphosat). Các tổ hợp tính trạng này tạo ra phương pháp phòng trừ các loài cỏ dại (và các loài tương tự) mới, do tính chống chịu mới thu được hoặc tính chống chịu vốn có với các thuốc diệt cỏ (ví dụ, glyphosat). Do vậy, ngoài tính trạng HTC, phương pháp phòng trừ cỏ dại mới bằng cách sử dụng các thuốc diệt cỏ, mà tính chống chịu thuốc diệt cỏ được tạo ra bởi enzym này trong cây trồng chuyển gen, nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ngoài ra, các cây trồng có tính chống chịu glyphosat sinh trưởng khắp nơi là phổ biến. Với các cây trồng có tính chống chịu glyphosat khác, việc phòng trừ các loài mọc tự nhiên có tính chống chịu glyphosat có thể khó hơn gấp nhiều lần so với cây trồng luân canh. Do vậy, việc sử dụng tính trạng chuyển gen theo sáng chế, kết hợp hoặc biến nạp riêng biệt vào cây trồng, tạo ra công cụ để phòng trừ các cây trồng mọc tự nhiên HTC khác.

Cây hoặc hạt được ưu tiên theo sáng chế đề xuất trong hệ gen của chúng trình tự cài xen, như được nhận diện trong bản mô tả này, cùng với ít nhất 20-500 hoặc nhiều hơn nucleotit nằm ở sườn bên kế tiếp ở cả hai mặt của đoạn cài xen, như được nhận diện trong bản mô tả này. Trừ khi có quy định khác, trình tự nằm ở sườn bên dùng để chỉ trình tự được nhận diện đối với SEQ ID NO:29 (xem bảng trên đây). Ngoài ra, SEQ ID NO:29 bao gồm ADN dị tương đồng được cài xen trong thể biến nạp gốc và trình tự hệ gen nằm ở sườn bên minh họa ngay sát với ADN đã được cài xen. Toàn bộ hoặc một phần trình tự nằm ở sườn bên này có thể được dự định chuyển vào thể hệ con tiếp nhận ADN đã được cài xen do kết quả của lai hữu tính dòng bố mẹ bao gồm gen này.

Sáng chế đề xuất việc nuôi cấy mô các tế bào cây có thể tái sinh theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm cây được tái sinh từ việc nuôi cấy mô này, cụ thể là tại nơi cây này có khả năng biểu hiện toàn bộ các đặc tính sinh lý học và hình thái học của biến thể gen được lấy làm ví dụ. Cây được ưu tiên theo sáng chế có toàn bộ các đặc tính sinh lý học và

hình thái học của cây sinh trưởng từ hạt đã được lưu giữ. Sáng chế còn đề xuất thế hệ con của hạt này và hạt có tính trạng chất lượng quan tâm.

Các thao tác (như đột biến, chuyển nhiễm tiếp, và nhân giống tiếp) với cây hoặc hạt, hoặc các bộ phận của chúng, có thể dẫn đến tạo ra cái có thể được gọi là các biến thể gen “về cơ bản có nguồn gốc”. Liên đoàn quốc tế về bảo vệ các biến thể gen cây mới (The International Union for the Protection of New Varieties of Plants - UPOV) đã đưa ra các nguyên tắc sau để xác định biến thể gen về cơ bản có nguồn gốc từ biến thể gen đã được bảo hộ:

[A] biến thể gen sẽ được cho là về cơ bản có nguồn gốc từ biến thể gen khác (“biến thể gen ban đầu”) khi

(i) biến thể gen chủ yếu có nguồn gốc từ biến thể gen ban đầu, hoặc từ bản thân biến thể gen chủ yếu có nguồn gốc từ biến thể gen ban đầu, trong khi vẫn giữ được sự biểu hiện của các đặc tính cần thiết thu được từ hệ gen hoặc tổ hợp các hệ gen của biến thể gen ban đầu;

(ii) khác biệt rõ rệt với biến thể gen ban đầu; và

(iii) ngoại trừ những khác nhau thu được từ sự tác động của nguồn gốc, nó thích nghi với biến thể gen ban đầu về sự biểu hiện của các đặc tính cần thiết thu được từ hệ gen hoặc tổ hợp các hệ gen của biến thể gen ban đầu.

UPOV, Hội nghị lần thứ sáu với các tổ chức quốc tế, Geneva, Oct. 30, 1992; tài liệu được chuẩn bị bởi Văn phòng của Liên đoàn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dòng” là nhóm cây có rất ít hoặc không có biến dị di truyền giữa các cá thể về ít nhất một tính trạng. Các dòng như vậy có thể được tạo ra nhờ một số thế hệ tự thụ phấn hoặc chọn lọc, hoặc sinh sản sinh dưỡng từ một bố mẹ bằng cách sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô hoặc tế bào.

Trong bản mô tả này, các thuật ngữ “cây trồng” và “biến thể gen” là đồng nghĩa và để chỉ dòng được sử dụng cho sản xuất thương mại.

“Độ ổn định” hoặc “ổn định” có nghĩa là đối với thành phần đã chọn, thành phần này được duy trì từ thế hệ này đến thế hệ khác và, tốt hơn là, ít nhất ba thế hệ về cơ bản là cùng mức, ví dụ, tốt hơn là $\pm 15\%$, tốt hơn nữa là $\pm 10\%$, tốt nhất là $\pm 5\%$. Độ ổn định có thể chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ, vị trí, ứng suất và thời gian gieo trồng. So sánh về các thế hệ sau đó trong các điều kiện hiện trường phải tạo ra thành phần này theo cách tương tự.

“Ứng dụng thương mại” được xác định là có sức sống tốt và khả năng sinh sản cao, sao cho cây trồng có thể được tạo ra bởi người nông dân bằng cách sử dụng công cụ canh tác thông thường, và dầu với các thành phần được mô tả có thể được chiết từ hạt bằng cách sử dụng phương tiện nghiền và chiết thông thường. Để có thể sử dụng trên thị trường, hiệu suất, được đo bằng khối lượng hạt, hàm lượng dầu, và tổng lượng dầu thu được trên mỗi mẫu, phải đạt trong vòng 15% hiệu suất trung bình của biến thể gen canolo thương phẩm so sánh khác mà không có tính trạng có giá trị cao sinh trưởng ở cùng khu vực.

“Tính ưu nông nghiệp” có nghĩa là dòng có các đặc tính nông học mong muốn như hiệu suất, tính thuần thực, tính chống chịu bệnh, và các đặc tính tương tự, ngoài tính chống chịu côn trùng do các gen theo sáng chế. Tính trạng hữu ích trong nông nghiệp, không kể ở dạng riêng rẽ hay kết hợp bất kỳ, như nêu trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, dưới đây, ở cây bao gồm một gen theo sáng chế, nằm trong phạm vi của sáng chế. Các đặc tính nông học bất kỳ và toàn bộ các đặc tính nông học và các điểm dữ liệu có thể được sử dụng để xác định các cây như vậy, ở dạng điểm hoặc ở một biên hoặc ở cả hai biên của khoảng đặc tính được sử dụng để xác định các cây như vậy.

Từ phần mô tả sáng chế người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, các phương án về kit phát hiện được ưu tiên, ví dụ, có thể bao gồm các đầu phát hiện và/hoặc các đoạn môi hướng đến và/hoặc bao gồm “trình tự nối” hoặc “trình tự đồng hoán” (tại đó trình tự nằm ở sườn bên hệ gen của ngô gặp trình tự đoạn cài xen). Ví dụ, trình tự này bao gồm các đầu phát hiện, các đoạn môi, và/hoặc sản phẩm khuếch đại polynucleotit được thiết kế để xác định một hoặc cả hai trình tự nối (tại đó đoạn cài xen gặp trình tự nằm ở sườn bên), như đã chỉ ra trong bảng 1. Một thiết kế phổ biến là có một đoạn môi lai hóa ở vùng nằm ở sườn bên, và một đoạn môi lai hóa ở đoạn cài xen. Mỗi đoạn môi như vậy thường có chiều dài ít nhất ~15 gốc. Với cách sắp xếp này, các đoạn môi có thể được sử dụng để tạo ra/khuếch đại sản phẩm khuếch đại có thể phát hiện đã chỉ ra sự có mặt của một gen theo sáng chế. Các đoạn môi này có thể được sử dụng để tạo ra sản phẩm khuếch đại kéo dài (và bao gồm) trình tự nối như đã chỉ ra trên đây.

Các đoạn môi "đổ" ở trình tự nằm ở sườn bên thường không được thiết kế để lai hóa cách khoảng 200 bazơ hoặc cách phần nối. Do vậy, các đoạn môi nằm ở sườn bên thông thường được thiết kế để bao gồm ít nhất 15 gốc của mỗi sợi trong vòng 200 bazơ vào trình tự nằm ở sườn bên từ phần bắt đầu của đoạn cài xen. Nghĩa là, các đoạn môi bao gồm trình

tự có kích cỡ gốc thích hợp ~1674-1873 và/hoặc ~6690-6890 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29 nằm trong phạm vi của sáng chế. Các đoạn môi cài xen có thể cũng được thiết kế bất kỳ chỗ nào trên đoạn cài xen, nhưng các gốc ~1874-2074 và ~6489-6689, có thể được sử dụng, ví dụ, không dành riêng cho việc thiết kế đoạn môi này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng sẽ hiểu rằng các đoạn môi và đầu phát hiện có thể được thiết kế để lai hóa, trong khoảng điều kiện lai hóa chuẩn và/hoặc các điều kiện PCR, với đoạn có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29 (hoặc đoạn bổ sung), và các đoạn bổ sung của chúng, trong đó đoạn môi hoặc đầu phát hiện không bổ sung hoàn toàn với trình tự được lấy làm ví dụ. Nghĩa là, một số mức không khớp có thể chấp nhận được. Đối với đoạn môi khoảng 20 nucleotit, ví dụ, thông thường một hoặc hai hoặc nhiều nucleotit không cần gắn kết với sợi đối diện nếu bazơ không khớp là ở bên trong hoặc trên phân biên của đoạn môi là sản phẩm khuếch đại đối diện. Các điều kiện lai hóa thích hợp khác nhau được đề xuất dưới đây. Các chất tương tự nucleotit tổng hợp như inosin cũng có thể được sử dụng trong các đầu phát hiện. Các đầu phát hiện axit peptit nucleic (PNA), cũng như các đầu phát hiện ADN và ARN, cũng có thể được sử dụng. Điều quan trọng là các đầu phát hiện và các đoạn môi này có thể chẩn đoán (có thể nhận diện duy nhất và sự khác biệt) về sự có mặt của một gen theo sáng chế.

Cần lưu ý rằng các sai lệch trong khuếch đại PCR có thể xảy ra có thể dẫn đến các sai lệch sắp xếp trình tự nhỏ, chẳng hạn. Nghĩa là, trừ khi có quy định khác, trình tự được nêu trong bản mô tả này được xác định bằng cách tạo ra sản phẩm khuếch đại dài từ ADN hệ gen của ngô, và tiếp theo tách dòng vô tính và sắp xếp trình tự sản phẩm khuếch đại. Không hiếm để tìm thấy những sai khác nhỏ và sự không thống nhất nhỏ trong trình tự được tạo ra và được xác định theo cách này, nhiều vòng khuếch đại cần thiết để tạo ra đủ sản phẩm khuếch đại để sắp xếp trình tự từ các ADN hệ gen. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng hiểu và lưu ý rằng việc điều chỉnh bất kỳ cần thiết do các sai lệch hoặc không thống nhất sắp xếp trình tự này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Cũng cần lưu ý rằng đối với một số trình tự hệ gen bị khuyết đoạn là điều không phổ biến, ví dụ, khi trình tự được cài xen trong quá trình tạo ra một gen. Do vậy, một số sai khác cũng có thể xuất hiện giữa trình tự nằm ở sườn bên theo sáng chế và trình tự hệ gen được nêu trong GENBANK, chẳng hạn.

Một số sai khác này được mô tả dưới đây trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Các điều chỉnh với các đầu phát hiện và các đoạn môi theo đó có thể được thực hiện.

Các thành phần của mỗi “đoạn cài xen” được minh họa trên các Fig. 1 và 2 và được mô tả một cách chi tiết hơn dưới đây trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Trình tự ADN polynucleotit của các thành phần này, hoặc các đoạn của chúng, có thể được sử dụng làm các đoạn môi ADN hoặc đầu phát hiện trong các phương pháp theo sáng chế.

Theo một số phương án theo sáng chế, chế phẩm và phương pháp được đề xuất để phát hiện sự có mặt của gen chuyển/vùng cài xen hệ gen, ở cây và hạt và các phần tương tự, từ cây ngô. Trình tự ADN được đề xuất bao gồm gen chuyển theo sáng chế/trình tự nối vùng cài xen hệ gen được đề xuất trong bản mô tả này (giữa các gốc 1873-1874 và 6689-6690 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:29), các đoạn của chúng, và đoạn bổ sung của trình tự được lấy làm ví dụ và các đoạn bất kỳ của chúng. Trình tự nối vùng cài xen kéo dài phần nối giữa ADN dị tương đồng được cài xen vào hệ gen và ADN từ tế bào ngô nằm ở sườn bên vị trí cài xen. Trình tự như vậy có thể chẩn đoán cho gen đã chọn.

Dựa vào trình tự cài xen và trình tự biên này, đoạn môi đặc hiệu gen có thể được tạo ra. Phân tích PCR đã chứng minh được rằng các dòng ngô theo sáng chế có thể được nhận diện ở các kiểu gen ngô khác nhau nhờ phân tích sản phẩm khuếch đại PCR được tạo ra bằng nhóm đoạn môi đặc hiệu gen này. Các phương pháp này và các phương pháp liên quan khác có thể được sử dụng để nhận diện duy nhất các dòng ngô này. Do vậy, sản phẩm khuếch đại PCR có nguồn gốc từ các cặp đoạn môi như vậy là duy nhất và có thể được sử dụng để xác định các dòng ngô này.

Theo một số phương án, trình tự ADN bao gồm đoạn kế tiếp của gen chuyển/vùng cài xen hệ gen là một khía cạnh theo sáng chế. Sáng chế cũng gồm trình tự ADN bao gồm polynucleotit của trình tự cài xen gen chuyển có đủ độ dài và polynucleotit của trình tự hệ gen của ngô có đủ độ dài từ một hoặc nhiều trong số ba cây ngô và/hoặc trình tự trên đây mà có thể dùng làm trình tự đoạn môi để tạo ra sản phẩm khuếch đại chẩn đoán cho một hoặc nhiều cây ngô này.

Các phương án liên quan đề xuất trình tự ADN bao gồm ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, hoặc nhiều nucleotit kế tiếp của phần gen chuyển của trình tự ADN được nhận diện trong bản mô tả này (như trình tự nêu trong SEQ ID NO:29 và các đoạn của chúng), hoặc các đoạn bổ sung của chúng, và độ dài tương tự của trình tự ADN nằm ở sườn bên của ngô từ trình tự này, hoặc các đoạn bổ sung của chúng. Trình tự như vậy có thể dùng làm các đoạn môi ADN trong các phương pháp khuếch đại ADN. Sản phẩm khuếch đại được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn môi

này có thể chẩn đoán cho gen bất kỳ trong số các gen ngô được đề cập trong bản mô tả này. Vì vậy, sáng chế cũng bao gồm sản phẩm khuếch đại được tạo ra bởi các đoạn môi ADN này và các đoạn môi tương đồng.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN, trong mẫu, tương ứng với biến thể gen ngô được đề cập trong bản mô tả này. Các phương pháp như vậy có thể bao gồm: (a) cho mẫu bao gồm ADN tiếp xúc với bộ đoạn môi mà, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN từ ít nhất một trong số các biến thể gen ngô, tạo ra sản phẩm khuếch đại chẩn đoán cho các gen này; (b) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, nhờ đó tạo ra sản phẩm khuếch đại; và (c) phát hiện sản phẩm khuếch đại.

Phương pháp phát hiện khác nữa theo sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN, trong mẫu, tương ứng với ít nhất một trong số các gen này, trong đó phương pháp này bao gồm: (a) cho mẫu bao gồm ADN tiếp xúc với đầu phát hiện lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với ADN từ ít nhất một trong số các biến thể gen ngô này và không lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt với cây ngô kiểm chứng (ADN không có gen quan tâm); (b) đưa mẫu và đầu phát hiện vào các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt; và (c) phát hiện lai hóa của đầu phát hiện với ADN.

Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây ngô bao gồm gen *aad-1* theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) lai hữu tính dòng ngô bố mẹ thứ nhất (bao gồm catxet biểu hiện theo sáng chế, mang tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ với cây của dòng này) và dòng ngô bố mẹ thứ hai (không có tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ này) nhờ đó tạo ra vô số thế hệ cây con; và (b) chọn lọc thế hệ cây con bằng cách sử dụng gen đánh dấu phân tử. Các phương pháp như vậy có thể tùy ý bao gồm bước lai ngược tiếp thế hệ cây con với dòng ngô bố mẹ thứ hai để tạo ra cây ngô nhân giống thực bao gồm tính trạng chống chịu với côn trùng.

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, phương pháp xác định hợp tử của thế hệ con của phép lai với một gen bất kỳ (hoặc nhiều) trong số ba gen được đề xuất. Các phương pháp này có thể bao gồm cho mẫu chứa ADN ngô tiếp xúc với bộ đoạn môi theo sáng chế. Các đoạn môi này, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ ít nhất một trong số các biến thể gen ngô này, tạo ra sản phẩm khuếch đại thứ nhất chẩn đoán cho ít nhất một trong số các biến thể gen ngô này. Các phương pháp như vậy còn bao gồm việc tiến hành phản ứng khuếch đại axit nucleic, nhờ đó tạo ra sản phẩm

khuếch đại thứ nhất; phát hiện sản phẩm khuếch đại thứ nhất; và cho mẫu bao gồm ADN ngô tiếp xúc với bộ đoạn môi này (bộ đoạn môi này, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ cây ngô, tạo ra sản phẩm khuếch đại thứ hai bao gồm ADN hệ gen tự nhiên của ngô tương đồng với vùng hệ gen của ngô; và tiến hành phản ứng khuếch đại axit nucleic, nhờ đó tạo ra sản phẩm khuếch đại thứ hai. Các phương pháp còn bao gồm phát hiện sản phẩm khuếch đại thứ hai, và so sánh sản phẩm khuếch đại thứ nhất và sản phẩm khuếch đại thứ hai trong mẫu, trong đó sự có mặt của cả hai sản phẩm khuếch đại cho thấy rằng mẫu là dị hợp tử với gen chuyển đoạn cài xen.

Kit phát hiện ADN có thể được phát triển bằng cách sử dụng chế phẩm được đề cập trong bản mô tả này và các phương pháp đã biết trong lĩnh vực phát hiện ADN. Kit có thể dùng để xác định ADN gen ngô theo sáng chế trong mẫu và có thể được dùng cho các phương pháp nhân giống cây ngô chứa ADN này. Kit chứa trình tự ADN tương đồng hoặc bổ sung với sản phẩm khuếch đại, ví dụ, được đề cập trong bản mô tả này, hoặc với trình tự ADN tương đồng hoặc bổ sung với ADN được chứa trong yếu tố di truyền gen chuyển của gen theo sáng chế. Trình tự này ADN có thể được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại ADN hoặc làm đầu phát hiện trong phương pháp lai hóa ADN. Kit có thể còn chứa các chất phản ứng và vật liệu cần thiết để thực hiện phương pháp phát hiện.

“Đầu phát hiện” là phân tử axit nucleic được phân lập được gắn vào phân tử đánh dấu hoặc phân tử thông báo có thể phát hiện được thông thường (như chất đồng vị phóng xạ, phốt pho, chất phát quang hóa học, hoặc enzyme). Đầu phát hiện này bổ sung với sợi axit nucleic đích, trong biến thể gen theo sáng chế, với sợi ADN hệ gen từ một trong số các biến thể gen ngô này, từ cây ngô hoặc từ mẫu bao gồm ADN từ gen. Các đầu phát hiện theo sáng chế không những bao gồm deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn bao gồm các polyamit và các vật liệu phát hiện khác gắn kết đặc hiệu với trình tự ADN đích và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của trình tự ADN đích này.

“Đoạn môi” là axit nucleic được phân lập/được tổng hợp được ghép với sợi ADN đích bổ sung nhờ lai hóa axit nucleic để tạo ra thể lai giữa đoạn môi và sợi ADN đích, tiếp theo mở rộng dọc sợi ADN đích nhờ polymeaza, ví dụ, ADN polymeaza. Các cặp đoạn môi theo sáng chế để chỉ việc sử dụng chúng để khuếch đại trình tự axit nucleic đích, ví dụ, bằng phản ứng chuỗi polymeaza (PCR) hoặc các phương pháp khuếch đại axit nucleic thông thường khác.

Các đầu phát hiện và các đoạn môi thường có chiều dài là 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, hoặc 500 polynucleotit hoặc nhiều hơn. Các đầu phát hiện và các đoạn môi này lai hóa đặc hiệu với trình tự đích trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt cao. Tốt hơn là, các đầu phát hiện và các đoạn môi theo sáng chế có trình tự hoàn chỉnh tương tự với trình tự đích, mặc dù các đầu phát hiện khác với trình tự đích và giữ khả năng lai hóa với trình tự đích có thể được thiết kế bằng các phương pháp thông thường.

Các phương pháp điều chế và sử dụng đầu phát hiện và đoạn môi được mô tả, ví dụ, trong *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook và các đồng tác giả, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Cặp đoạn môi PCR có thể có nguồn gốc từ trình tự đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình máy tính được dự định cho mục đích đó.

Các đoạn môi và đầu phát hiện dựa vào ADN nằm ở sườn bên và trình tự cài xen được đề cập trong bản mô tả này có thể được sử dụng để khẳng định (và, nếu cần, để chỉnh sửa) trình tự được đề cập bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách tái tách dòng vô tính và sắp xếp trình tự trình tự này.

Các đầu phát hiện axit nucleic và các đoạn môi theo sáng chế lai hóa trong các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự ADN đích. Phương pháp lai hóa axit nucleic hoặc phương pháp khuếch đại thông thường bất kỳ có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của ADN từ gen chuyển trong mẫu. Phân tử axit nucleic hoặc các đoạn của chúng có khả năng lai hóa đặc hiệu với phân tử axit nucleic khác trong một số biến thể gen. Như được sử dụng trong bản mô tả này, hai phân tử axit nucleic đã đề cập có khả năng lai hóa đặc hiệu với nhau nếu hai phân tử có khả năng tạo thành cấu trúc axit nucleic sợi kép không song song. Phân tử axit nucleic được đề cập là đoạn “bổ sung” của phân tử axit nucleic khác nếu chúng có tính bổ sung hoàn toàn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, phân tử đã đề cập có “tính bổ sung hoàn toàn” khi mọi nucleotit của một trong số các phân tử bổ sung với nucleotit của phân tử khác. Hai phân tử đã đề cập là “bổ sung rất nhỏ” nếu chúng có thể lai hóa với nhau với đủ độ ổn định để cho phép chúng duy trì ghép với nhau trong tối thiểu điều kiện “nghiêm ngặt thấp” thông thường. Tương tự, phân tử đã đề cập là “bổ sung” nếu chúng có thể lai hóa với nhau với đủ độ ổn định để cho phép chúng duy trì ghép với nhau trong các điều kiện “nghiêm ngặt cao” thông thường. Các điều kiện nghiêm ngặt cao thông thường được mô tả bởi Sambrook và các đồng tác giả, 1989. Sự lệch hướng từ tính bổ sung hoàn toàn vì vậy có thể được cho phép, chừng nào mà sự lệch hướng này không ngăn cản hoàn toàn khả năng phân tử tạo ra cấu trúc sợi kép. Để dùng phân tử axit nucleic làm đoạn môi hoặc đầu phát hiện chỉ cần bổ sung đủ trình tự để có thể tạo ra cấu trúc sợi kép ổn định trong dung môi cụ thể và các nồng độ muối được sử dụng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự về cơ bản là đồng nhất là trình tự axit nucleic sẽ lai hóa đặc hiệu với đoạn bổ sung của trình tự axit nucleic mà nó được so sánh trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” đã được xác

định về mặt chức năng liên quan đến việc lai hóa đầu phát hiện axit nucleic với axit nucleic đích (tức là, với trình tự axit nucleic cụ thể quan tâm) nhờ quy trình lai hóa đặc hiệu được thảo luận trong Sambrook và các đồng tác giả, 1989, ở 9,52-9,55. Ngoài ra, xem Sambrook và các đồng tác giả, 1989 ở 9,47-9,52 và 9,56-9,58. Do đó, trình tự nucleotit theo sáng chế có thể được sử dụng trong khả năng của chúng để tạo thành một cách chọn lọc phân tử kép với các đoạn ADN đuôi bổ sung.

Tùy thuộc vào ứng dụng dự định, có thể sử dụng các điều kiện lai hóa khác nhau để đạt được mức độ chọn lọc khác nhau đầu phát hiện xuôi trình tự đích. Đối với các ứng dụng đòi hỏi độ chọn lọc cao, thông thường sẽ dùng điều kiện nghiêm ngặt tương đối để tạo ra các thể lai, ví dụ, người ta sẽ chọn lọc điều kiện nồng độ muối tương đối thấp và/hoặc điều kiện nhiệt độ tương đối cao, như được đề xuất trong khoảng từ 0,02M đến 0,15M NaCl ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 70°C. Điều kiện nghiêm ngặt, ví dụ, có thể bao gồm rửa bộ lọc lai hóa ít nhất hai lần với dung dịch đệm rửa nghiêm ngặt cao (0,2X SSC, SDS 0,1%, 65°C). Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp thúc đẩy quá trình lai hóa ADN, ví dụ, 6,0X natri clorua/natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C, tiếp đó là rửa 2,0X SSC ở 50°C là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, 6,3,1-6,3,6. Ví dụ, nồng độ muối trong bước rửa có thể được chọn từ điều kiện nghiêm ngặt thấp khoảng 2,0X SSC ở 50°C đến điều kiện nghiêm ngặt cao khoảng 0,2X SSC ở 50°C. Ngoài ra, nhiệt độ trong bước rửa có thể được tăng lên từ điều kiện nghiêm ngặt thấp ở nhiệt độ trong phòng, khoảng 22°C, đến điều kiện nghiêm ngặt cao ở khoảng 65°C. Cả nhiệt độ và nồng độ muối đều có thể được thay đổi, hoặc nhiệt độ hoặc nồng độ muối có thể được giữ không đổi trong khi điều kiện kia được thay đổi. Các điều kiện chọn lọc như vậy chấp nhận rất ít, nếu có, sự không khớp giữa đầu phát hiện và khuôn mẫu hoặc sợi đích. Phát hiện trình tự ADN qua lai hóa là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, và phân mô tả của các patent Mỹ số 4,965,188 và 5,176,995 được lấy làm ví dụ về các phương pháp phân tích lai hóa.

Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, axit nucleic theo sáng chế sẽ lai hóa một cách đặc hiệu với một hoặc nhiều đoạn môi (hoặc sản phẩm khuếch đại hoặc trình tự khác) được lấy làm ví dụ hoặc đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm các đoạn bổ sung và các đoạn của chúng, trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Theo một khía cạnh theo sáng chế, phân tử axit nucleic đánh dấu theo sáng chế có trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO:3-14, hoặc các đoạn bổ sung và/hoặc các đoạn của chúng.

Theo một khía cạnh khác theo sáng chế, phân tử axit nucleic đánh dấu theo sáng chế có trong khoảng từ 80% đến 100% hoặc trong khoảng từ 90% đến 100% trình tự tương đồng với trình tự axit nucleic này. Theo một khía cạnh khác nữa theo sáng chế, phân tử axit nucleic đánh dấu theo sáng chế có trong khoảng từ 95% đến 100% trình tự tương đồng với trình tự này. Trình tự như vậy có thể được sử dụng làm gen đánh dấu trong phương pháp nhân giống để xác định thế hệ con của phép lai di truyền. Lai hóa đầu phát hiện với phân tử ADN đích có thể được phát hiện bằng nhiều phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, các phương pháp này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhãn phát huỳnh quang, nhãn phóng xạ, nhãn trên cơ sở kháng thể, và nhãn phát quang hóa học.

Liên quan đến việc khuếch đại trình tự axit nucleic đích (ví dụ, bằng PCR) sử dụng cặp đoạn mồi khuếch đại cụ thể, “điều kiện nghiêm ngặt” là các điều kiện cho phép cặp đoạn mồi chỉ lai hóa với đích axit nucleic trình tự mà đoạn mồi có trình tự kiểu đại tương ứng (hoặc đoạn bổ sung của nó) gắn kết và tốt hơn là để tạo ra sản phẩm khuếch đại duy nhất, sản phẩm khuếch đại.

Thuật ngữ “đặc hiệu cho (trình tự đích)” cho thấy rằng đầu phát hiện hoặc đoạn mồi lai hóa trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt chỉ với trình tự đích trong mẫu bao gồm trình tự đích.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “ADN được khuếch đại” hoặc “sản phẩm khuếch đại” dùng để chỉ sản phẩm của khuếch đại axit nucleic của trình tự axit nucleic đích là một phần của khuôn mẫu axit nucleic. Ví dụ, để xác định cây ngô thu được từ phép lai hữu tính chứa ADN hệ gen của biến thể gen chuyển gen từ cây ngô theo sáng chế, ADN được chiết từ mẫu mô cây ngô có thể được đưa vào phương pháp khuếch đại axit nucleic bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi bao gồm đoạn mồi có nguồn gốc từ trình tự nằm ở sườn bên trong hệ gen của cây liên kết với vị trí đoạn cài xen của ADN đã được cài xen dị tương đồng, và đoạn mồi thứ hai có nguồn gốc từ ADN đã được cài xen dị tương đồng để tạo ra sản phẩm khuếch đại chẩn đoán cho sự có mặt của ADN gen. Sản phẩm khuếch đại có chiều dài và có trình tự cũng chẩn đoán cho gen. Sản phẩm khuếch đại có thể có chiều dài nằm trong khoảng từ chiều dài kết hợp của các cặp đoạn mồi cộng với một cặp bazơ nucleotit, và/hoặc chiều dài kết hợp của các cặp đoạn mồi cộng với chiều dài khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53,

54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, hoặc 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, hoặc nhiều hơn cặp bazơ nucleotit (cộng với hoặc không có bất kỳ trong số các số gia được nêu trên đây). Theo cách khác, cặp đoạn môi có thể có nguồn gốc từ trình tự nằm ở sườn bên ở cả hai phía của ADN đã được cài xen để tạo ra sản phẩm khuếch đại bao gồm toàn bộ trình tự nucleotit cài xen. Đoạn môi của cặp đoạn môi có nguồn gốc từ trình tự hệ gen cây có thể được định vị một khoảng cách với trình tự ADN đã được cài xen. Khoảng cách này có thể nằm trong khoảng từ một cặp bazơ nucleotit lên đến hai mươi nghìn cặp bazơ nucleotit. Việc sử dụng thuật

ngữ “sản phẩm khuếch đại” không bao gồm cụ thể các đoạn mỗi dime có thể được tạo thành trong phản ứng khuếch đại nhiệt ADN.

Việc khuếch đại axit nucleic có thể đạt được bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp khuếch đại axit nucleic đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm phản ứng chuỗi polymeaza (PCR). Nhiều phản ứng khuếch đại đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, không kể những cái khác, trong patent Mỹ số 4,683,195 và patent Mỹ số 4,683,202. Phương pháp khuếch đại PCR đã được phát triển để khuếch đại lên đến 22 kb ADN hệ gen. Các phương pháp này cũng như các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực khuếch đại ADN có thể được sử dụng trong thực tế theo sáng chế. Trình tự của đoạn cài xen ADN gen chuyển dị tương đồng hoặc trình tự hệ gen nằm ở sườn bên từ biến thể gen ngô theo sáng chế có thể được kiểm tra (và được sửa chữa nếu cần) bằng cách khuếch đại trình tự này từ gen bằng cách sử dụng các đoạn mỗi có nguồn gốc từ trình tự được đề xuất trong bản mô tả này tiếp đó là sắp xếp trình tự ADN chuẩn sản phẩm khuếch đại PCR hoặc ADN đã được tách dòng vô tính.

Sản phẩm khuếch đại được tạo ra bởi các phương pháp này có thể được phát hiện bằng rất nhiều kỹ thuật. Điện di trên gel agarosa và nhuộm với ethidi bromua là phương pháp phát hiện sản phẩm khuếch đại ADN đã biết thông thường. Một phương pháp khác là phân tích bit di truyền trong đó ADN oligonucleotit được thiết kế chồng lợp lên both trình tự ADN nằm ở sườn bên hệ gen liên kề và trình tự ADN đã được cài xen. Oligonucleotit được cố định trong các lỗ của đĩa vi lỗ. Sau khi PCR vùng quan tâm (bằng cách sử dụng một đoạn mỗi trong trình tự đã được cài xen và một đoạn mỗi trong trình tự hệ gen nằm ở sườn bên liên kề), sản phẩm PCR sợi đơn có thể được lai hóa với oligonucleotit cố định và dùng làm khuôn mẫu cho phản ứng kéo dài một bazơ bằng cách sử dụng ADN polymeaza và ddNTP được đánh dấu đặc hiệu cho bazơ mong muốn tiếp theo. Việc đọc ra có thể dựa vào phát huỳnh quang hoặc ELISA. Tín hiệu chỉ ra sự có mặt của trình tự cài xen/trình tự nằm ở sườn bên do khuếch đại, lai hóa, và kéo dài một bazơ thành công.

Phương pháp khác là kỹ thuật giải trình tự (Pyrosequencing technique) như được mô tả bởi Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). Trong phương pháp này oligonucleotit được thiết kế chồng lợp lên ADN hệ gen liên kề và phần nối ADN cài xen. Oligonucleotit được lai hóa với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng quan tâm (một đoạn mỗi trong trình tự đã được cài xen và một đoạn mỗi trong trình tự hệ gen nằm ở sườn bên) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeaza, ATP, sulfurylaza, luxiferaza, apyrazaza, adenosin

5' phosphosulfat và luxiferin. DNTP được bổ sung riêng biệt và sự hợp nhất dẫn đến việc tín hiệu ánh sáng được đo. Tín hiệu ánh sáng chỉ ra sự có mặt của trình tự cài xen gen chuyển/trình tự nằm ở sườn bên do khuếch đại, lai hóa, và kéo dài một hoặc nhiều bazơ thành công.

Phân cực huỳnh quang là phương pháp khác có thể được sử dụng để phát hiện sản phẩm khuếch đại theo sáng chế. Sau phương pháp này, oligonucleotit được thiết kế chồng lợp lên đoạn nối nằm ở sườn bên hệ gen và đoạn nối ADN đã được cài xen. Oligonucleotit được lai hóa với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng quan tâm (một đoạn mỗi trong ADN đã được cài xen và một đoạn mỗi trong trình tự ADN nằm ở sườn bên hệ gen) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeaza và ddNTP được đánh dấu huỳnh quang. Việc kéo dài một bazơ dẫn đến sự hợp nhất của ddNTP. Sự hợp nhất có thể được đo bằng sự thay đổi về phân cực bằng cách sử dụng huỳnh quang kế. Sự thay đổi về phân cực chỉ ra sự có mặt của trình tự cài xen gen chuyển/trình tự nằm ở sườn bên do khuếch đại, lai hóa, và kéo dài một bazơ thành công.

TAQMAN (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) là phương pháp phát hiện và định lượng sự có mặt của trình tự ADN. Tóm lại, đầu phát hiện FRET oligonucleotit được thiết kế chồng lợp lên phần nối hệ gen nằm ở sườn bên và phần nối ADN cài xen. Đầu phát hiện FRET và các đoạn mỗi PCR (một đoạn mỗi trong trình tự đoạn cài xen ADN và một đoạn mỗi trong trình tự hệ gen nằm ở sườn bên) được đóng vòng với sự có mặt của polymeaza ổn nhiệt và DNTP. Trong quá trình khuếch đại đặc hiệu, Taq ADN polymeaza làm sạch và giải phóng gốc huỳnh quang ra khỏi gốc dừng trên đầu phát hiện FRET. Tín hiệu phát huỳnh quang chỉ ra sự có mặt của trình tự nằm ở sườn bên/trình tự cài xen gen chuyển do khuếch đại và lai hóa thành công.

Đã mô tả phân tử Beacons được sử dụng trong phát hiện trình tự. Tóm lại, đầu phát hiện FRET oligonucleotit được thiết kế chồng lợp lên phần nối nằm ở sườn bên hệ gen và phần nối ADN cài xen. Cấu trúc duy nhất của đầu phát hiện FRET dẫn đến việc nó chứa cấu trúc bậc hai giữ gốc huỳnh quang và gốc dừng ở trạng thái gần nhau. Đầu phát hiện FRET và các đoạn mỗi PCR (một đoạn mỗi trong trình tự đoạn cài xen ADN và một đoạn mỗi trong trình tự hệ gen nằm ở sườn bên) được đóng vòng với sự có mặt của polymeaza ổn nhiệt và DNTP. Sau khi khuếch đại PCR thành công, lai hóa đầu phát hiện FRET với trình tự đích dẫn đến loại bỏ cấu trúc đầu phát hiện bậc hai và tách về mặt không gian gốc huỳnh quang và gốc dừng. Thu được tín hiệu phát huỳnh quang. Tín hiệu phát huỳnh

quang chỉ ra sự có mặt của trình tự nằm ở sườn bên hệ gen/trình tự cài xen gen chuyển do khuếch đại và lai hóa thành công.

Sáng chế đề xuất vị trí trong hệ gen của ngô là mỹ mãn cho cài xen, sáng chế cũng bao gồm hạt ngô và/hoặc cây ngô bao gồm ít nhất một đoạn cài xen không aad1 ở vùng lân cận chung của vị trí hệ gen này. Một lựa chọn là thay thế đoạn cài xen khác nhau thay vào chỗ đoạn cài xen AAD-1 được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này. Theo khía cạnh chung này, tái tổ hợp tương đồng hướng đích, ví dụ, có thể được sử dụng theo sáng chế. Công nghệ này là đối tượng sáng chế của, ví dụ, WO 03/080809 A2 và đơn patent Mỹ đồng dạng (US 20030232410). Do vậy, sáng chế đề xuất cây và các tế bào cây bao gồm đoạn cài xen dị tương đồng (thay vào chỗ hoặc với nhiều bản sao của AAD-1), bị nằm ở sườn bên bởi tất cả hoặc một phần có thể đã được thừa nhận trình tự nằm ở sườn bên đã được nhận diện trong bản mô tả này (ví dụ, các gốc 1-1873 và 6690-8557 của trình tự nêu trong SEQ ID NO:29).

Tất cả các patent, đơn yêu cầu cấp patent, đơn tạm thời, và các công bố được viện dẫn đến hoặc được nêu trong bản mô tả này được đưa nội dung vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn mà không mâu thuẫn với nội dung của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau nhằm minh họa các phương pháp để thực hiện sáng chế và chứng minh một số phương án được ưu tiên theo sáng chế. Các ví dụ này không giới hạn phạm vi của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng kỹ thuật được đề cập trong các ví dụ sau là các phương pháp cụ thể được sử dụng để minh họa các cách được ưu tiên để thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, trong phạm vi sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng cần hiểu rằng nhiều thay đổi có thể được thực hiện theo các phương án cụ thể này trong khi vẫn thu được các kết quả biến thể gen hoặc tương tự mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Trừ khi có quy định khác, tất cả phần trăm đều tính theo khối lượng và tất cả các tỷ lệ hỗn hợp dung môi là tính theo thể tích trừ khi có quy định khác.

Các từ viết tắt sau được sử dụng trừ khi có quy định khác.

AAD-1	aryloxyalkanoat dioxyaza-1
bp	cặp bazơ
°C	độ Celcius
ADN	axit deoxyribonucleic

DIG	đigoxigenin
EDTA	axit etylendiamintetraaxetic
kb	kilobazơ
ug	microgam
uL	microlit
mL	mililit
M	khối lượng mol
OLP	đầu phát hiện chống lợp lên
PCR	phản ứng chuỗi polymeaza
PTU	đơn vị bản sao cây
SDS	natri đodexyl sulfat
SOP	quy trình điều hành chuẩn
SSC	dung dịch đệm của hỗn hợp chứa natri clorua và natri xitrat, độ pH 7,0
TBE	dung dịch đệm của hỗn hợp chứa bazơ Tris, axit boric và EDTA, độ pH 8,3
V	vôn

Ví dụ 1. Biến nạp và chọn lọc gen AAD1 pDAS1740-278

Gen AAD1, pDAS1740-278, được tạo ra bởi biến nạp qua trung gian WHISKER dòng ngô Hi-II. Phương pháp biến nạp được sử dụng được mô tả trong đơn patent Mỹ # 20090093366. Đoạn FspI của plasmit pDAS1740, còn được gọi là pDAB3812, (Fig. 1) được biến nạp vào dòng ngô. Cấu trúc plasmit này chứa catxet biểu hiện cây chứa RB7 MARv3 :: Zea mays Ubiquitin 1 gen khởi đầu v2 // AAD1 v3 // Zea mays PER5 3'UTR :: RB 7 MARv4 đơn vị bản sao cây (PTU).

Rất nhiều gen được tạo ra. Các gen này sống và được tạo ra khỏe mạnh, mô sẹo có tính chống chịu haloxyfop đã chỉ ra các mã xác định duy nhất là biến thể gen biến nạp giả định, và được chuyển liên tục vào môi trường chọn lọc sạch. Các cây được tái sinh từ mô có nguồn gốc từ mỗi biến thể gen duy nhất và được chuyển vào nhà kính.

Các mẫu lá được lấy để phân tích phân tử để xác định sự có mặt của gen chuyển AAD-1 nhờ thẩm tách Southern, xác nhận biên ADN, và xác nhận có trợ giúp của gen đánh dấu hệ gen. Các cây T0 dương tính được thụ phấn với các dòng lai nội phối để thu được hạt T1. Cây T1 của biến thể gen pDAS1470-278-9 (DAS-40278-9) được chọn, tự thụ phấn và xác định đặc điểm cho năm thế hệ. Trong khi đó, các cây T1 được lai chéo ngược và lai nhập gen vào chất mầm loại ưu (XHH13) qua chọn lọc có trợ giúp của gen đánh dấu đối với một vài thế hệ. Biến thể gen này được tạo ra từ thể phân lập biến nạp độc lập. Biến thể gen được chọn dựa vào các đặc tính duy nhất của nó như một vị trí cài xen, phân ly Mendel bình thường và biểu hiện một cách ổn định, và sự kết hợp cực hiệu quả, bao gồm

đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ và các đặc tính nông học trong và qua nhiều vị trí trong môi trường. Các ví dụ sau chứa dữ liệu được sử dụng để xác định đặc điểm biến thể gen pDAS-1740-278-9.

Ví dụ 2. Xác định đặc điểm biến thể gen pDAS1740-278-9 qua thẩm tách Southern

Phân tích thẩm tách Southern được sử dụng để thiết lập kiểu xâm nhập của ADN đã được cài xen đoạn và xác định số lượng đoạn cài xen/bản sao của gen *aad-1* trong biến thể gen pDAS-1740-278-9 (DAS-40278-9). Dữ liệu được tạo ra để chứng minh quá trình xâm nhập và tính nguyên vẹn của gen chuyển *aad-1* được cài xen vào hệ gen ngô. Dữ liệu thẩm tách Southern đã đưa ra giả thuyết rằng đoạn pDAS1740/*Fsp* I cài xen ở biến thể gen ngô DAS-40278-9 xảy ra dưới dạng xâm nhập đơn giản của một bản sao nguyên vẹn của AAD-1 PTU từ plasmit pDAS1740. Phân tích thẩm tách Southern chi tiết được tiến hành sử dụng đầu phát hiện đặc hiệu với gen, trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc, và các yếu tố điều hòa khác được chứa trong vùng plasmit và enzym giới hạn mô tả có các vị trí phân cắt định vị trong plasmit và tạo ra các đoạn lai bên trong với plasmit hoặc các đoạn kéo dài phần nối của plasmit với ADN hệ gen của ngô (các đoạn biên). Khối lượng phân tử đã chỉ ra từ lai hóa Southern để kết hợp enzym giới hạn và đầu phát hiện là duy nhất cho biến thể gen này, và thiết lập kiểu nhận diện nó. Các phân tích này cũng cho thấy rằng đoạn plasmit đã được cài xen vào ADN hệ gen của ngô mà không có quá trình chuyển vị của *aad-1* PTU. Quan sát được các đoạn lai hóa biến thể gen nhau ở năm thế hệ riêng biệt của biến thể gen ngô chuyển gen DAS-40278-9 chỉ ra độ ổn định của tính kế thừa của các thế hệ lai cài xen *aad-1* PTU. Lai hóa với hỗn hợp chứa ba đầu phát hiện khung chính được định vị bên ngoài vị trí giới hạn của *Fsp* I trên plasmit pDAS1740 không phát hiện các đoạn ADN/gen đặc hiệu bất kỳ, chỉ ra sự không có mặt của gen chống chịu Ampixilin và sự không có mặt của vùng khung chính vật truyền khác ngay sát với các vị trí giới hạn *Fsp* I của plasmit pDAS1740 ở biến thể gen ngô chuyển gen DAS-40278-9. Bản đồ minh họa về đoạn cài xen ở biến thể gen ngô AAD-1 DAS-40278-9 được thể hiện trên các Fig. 2-3.

Ví dụ 2.1. Thu gom mẫu lá ngô và phân lập ADN hệ gen (gADN)

gADN được chuẩn bị từ lá của các cây riêng lẻ của biến thể gen ngô AAD-1 DAS-40278-9. gADN được chiết từ mô lá được thu hoạch từ các cây riêng lẻ mang biến thể gen

ngô AAD-1 DAS-40278-9. Hạt ngô chuyển gen từ năm thế hệ riêng biệt của biến thể gen DAS-40278-9 được sử dụng. Hai mươi cây ngô riêng lẻ, có nguồn gốc từ bốn cây cho mỗi thế hệ, đối với biến thể gen DAS-40278-9 được chọn. Ngoài ra, gADN được phân lập từ cây ngô thông thường, XHH13, chứa cơ sở di truyền là đại diện của dòng chất, không có mặt gen *aad-1*.

Trước khi tách gADN, các nhánh lá được lấy từ mỗi cây để thử nghiệm biểu hiện Protein AAD-1 bằng cách sử dụng kit thử nghiệm nhanh (American Bionostica, Swedesboro, NJ) theo quy trình của nhà sản xuất đề xuất. Mỗi mẫu nhánh lá được đưa ra lần lượt ghi điểm + hoặc - về sự có mặt hoặc không có mặt của *aad-1*. Chỉ các cây dương tính từ năm thế hệ của biến thể gen DAS-40278-9 được đưa vào xác định đặc điểm tiếp.

Các mẫu lá ngô được thu gom từ các cây riêng lẻ của biến thể gen DAS-40278-9 và mẫu đối chứng thông thường XHH13. Các mẫu lá được làm đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và được cất giữ ở khoảng -80°C cho đến khi sử dụng.

ADN hệ gen riêng lẻ được chiết từ mô lá ngô đã được làm đông lạnh theo phương pháp CTAB chuẩn. Nếu cần, một số ADN hệ gen được tinh chế tiếp với Qiagen Genomic-Tip (Qiagen, Valencia, CA) theo các phương pháp của nhà sản xuất đề xuất. Sau khi chiết, ADN được định lượng bằng máy đo huỳnh quang phổ khối bằng cách sử dụng chất phản ứng Pico Green (Invitrogen, Carlsbad, CA). ADN tiếp theo được hiển thị trên gel agarosa để khẳng định các giá trị từ phân tích Pico Green và để xác định chất lượng ADN.

Ví dụ 2.2. Phân cắt và tách ADN

Để xác định đặc điểm phân tử của ADN, chín microgam (9µg) ADN hệ gen từ mẫu ADN của biến thể gen ngô DAS-40278-9 và mẫu đối chứng thông thường được phân cắt bằng cách bổ sung trong khoảng từ năm đến mười một đơn vị được chọn enzym giới hạn cho mỗi µg ADN và dung dịch đệm phản ứng tương ứng vào mỗi mẫu ADN. Mỗi mẫu được ủ ở khoảng 37°C qua đêm. Các enzym giới hạn *EcoR* I, *Nco* I, *Sac* I, *Fse* I, và *Hind* III được sử dụng cho các phân cắt (New England Biolabs, Ipswich, MA). Mẫu lai hóa đối chứng dương tính được điều chế bằng cách tổ hợp ADN plasmit, pDAS1740 (pDAB3812), với ADN hệ gen từ ngô đối chứng thông thường ở tỷ lệ khoảng tương đương với 1 bản sao của gen chuyển cho mỗi hệ gen của ngô, và phân cắt bằng cách sử dụng các phương pháp và enzym giới hạn biến thể gen như các mẫu thử nghiệm. ADN từ ngô đối chứng ngô

thông thường (XHH13) được phân cắt bằng cách sử dụng các phương pháp và các enzym giới hạn biến thể gen như các mẫu thử nghiệm để dùng làm mẫu đối chứng âm tính.

Các mẫu ADN đã phân cắt được kết tủa với Quick-Precip (Edge BioSystems, Gaithersburg, MD) và tái tạo huyền phù trong 1× Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, CA) để đạt được thể tích mong muốn để tải gel. Mẫu ADN và gen đánh dấu kích cỡ phân tử tiếp theo được điện di qua 0,8% gel agarosa với 1× dung dịch đệm TBE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) ở điện áp 55-65 vôn trong khoảng thời gian từ 18 đến 22 giờ để đạt được đoạn tách. Gel được nhuộm bằng ethidi bromua (Invitrogen, Carlsbad, CA) và ADN được hiển thị dưới ánh sáng tia cực tím (UV).

Ví dụ 2.3. Phương pháp truyền Southern và xử lý màng

Phân tích thẩm tách Southern được thực hiện về cơ bản như được mô tả bởi Memelink, và các đồng tác giả (1994) Southern, Northern, and Western Blot Analysis. Plant Mol. Biol. Manual F1:1-23. Tóm lại, sau khi tách bằng điện di và việc hiển thị của các đoạn ADN, gel được khử purin với HCl 0,25N (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) trong khoảng 15 phút, và tiếp theo được tiếp xúc với dung dịch biến tính (AccuGENE, Sigma, St. Louis, MO) trong khoảng 30 phút tiếp đó là dung dịch trung hoà (AccuGENE, Sigma, St. Louis, MO) trong tối thiểu 30 phút. Truyền Southern được thực hiện qua đêm trên màng nilon (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) bằng cách sử dụng hệ mao dẫn với 10×SSC (Sigma, St. Louis, MO). Sau khi chuyển màng được rửa trong 2× dung dịch SSC và ADN được gắn với màng nhờ tạo liên kết ngang UV. Quy trình này dẫn đến màng thẩm tách Southern sẵn có để lai hóa.

Ví dụ 2.4. Đánh dấu đầu phát hiện ADN và lai hóa

Các đoạn ADN gắn kết với màng nylon được phát hiện bằng cách sử dụng đầu phát hiện đã được đánh dấu. Các đầu phát hiện được sử dụng để nghiên cứu được tạo ra bởi sự hợp nhất trên cơ sở PCR nucleotit được đánh dấu digoxigenin (DIG), [DIG-11]-dUTP, từ các đoạn được tạo ra bởi các đoạn môi đặc hiệu với các yếu tố gen và các vùng khác từ plasmid pDAS1740. Việc tạo ra các đầu phát hiện ADN nhờ tổng hợp PCR được thực hiện bằng cách sử dụng kit đầu phát hiện tổng hợp PCR DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis,

IN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Danh mục các đầu phát hiện được sử dụng để nghiên cứu được mô tả trong bảng 1.

Bảng 1. Định vị và độ dài của các đầu phát hiện được sử dụng trong phân tích Southern

Tên đầu phát hiện	Yếu tố di truyền	Vị trí trên pDAS1740 (bp)	Chiều dài (bp)
OLP1-3	trình tự khởi đầu ubiquitin (ZmUbi1)	28-2123	2096
OLP2	gen <i>aad-1</i>	2103-3022	920
OLP3A	trình tự kết thúc peroxidaza (ZmPer5)	3002-3397	396
OLP3B	RB7 Mar v4	3375-4865	1491
OLP4ABC	Khung chính (OLP4A)	4900-5848	949
	Khung chính Ap ^r gen (OLP4B)	5828-6681	855
	Khung chính (OLP4C)	6660-7144	485
OLP5-2	RB7 Mar v3	7124-8507	1384

Các đầu phát hiện đã được đánh dấu được phân tích bằng điện di trên gel agarosa để xác định chất lượng và số lượng của chúng. Lượng đầu phát hiện đã được đánh dấu mong muốn tiếp theo được sử dụng để lai hóa với đích ADN trên màng nylon để phát hiện các đoạn đặc hiệu ảnh bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả cho dung dịch DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Tóm lại, màng nylon thấm tách với ADN được cố định trên được rửa sơ bộ trong 2×SSC và được lai hóa sơ bộ với 20-25mL dung dịch DIG Easy Hyb đã được làm ấm sơ bộ trong các chai lai hóa ở khoảng 50°C trong tối thiểu 30 phút trong tủ sấy lai hóa. Dung dịch đã được lai hóa sơ bộ tiếp theo được lắng gạn, và thay bằng 20mL dung dịch DIG Easy Hyb đã được làm ấm sơ bộ chứa lượng đầu phát hiện đặc hiệu mong muốn đã được làm biến tính sơ bộ bằng cách đun sôi trong nước trong 5 phút. Bước lai hóa tiếp theo được tiến hành ở khoảng 40-60°C qua đêm trong tủ sấy lai hóa.

Ví dụ 2.5. Phát hiện

Ở phần cuối của đầu phát hiện lai hóa, dung dịch DIG Easy Hyb chứa các đầu phát hiện được lắng gạn, vào ống sạch và được cất giữ ở -20°C . Các đầu phát hiện này có thể được tái sử dụng trong 2-3 lần theo quy trình của nhà sản xuất. Màng thấm tách được rửa sơ bộ và được rửa hai lần trong vật đựng bằng chất dẻo sạch với dung dịch đệm rửa nghiêm ngặt thấp ($2\times\text{SSC}$, $\text{SDS } 0,1\%$) trong khoảng 5 phút ở nhiệt độ trong phòng, tiếp đó là rửa hai lần với dung dịch đệm rửa nghiêm ngặt cao ($0,1\times\text{SSC}$, $\text{SDS } 0,1\%$) trong mỗi 15 phút ở khoảng 65°C . Màng thấm tách tiếp theo được chuyển vào vật đựng bằng chất dẻo sạch khác và được rửa sơ bộ với $1\times$ dung dịch đệm rửa từ nhóm dung dịch đệm rửa và nằm ở sườn bên DIG (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) trong khoảng 2 phút, xử lý nằm ở sườn bên trong $1\times$ dung dịch đệm nằm ở sườn bên trong tối thiểu 30 phút, tiếp đó là ủ với kháng thể kháng DIG-AP (dung dịch kiểm phosphataza) (tỷ lệ pha loãng 1:5,000, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) trong $1\times$ dung dịch đệm nằm ở sườn bên trong tối thiểu 30 phút. Sau từ 2-3 lần rửa với $1\times$ dung dịch đệm rửa, các đầu phát hiện ADN đặc hiệu duy trì gắn kết với thấm tách màng và chuẩn ADN được đánh dấu DIG được hiển thị bằng cách sử dụng hệ phát hiện axit nucleic phát quang hóa học hình sao CDP (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thấm tách được tiếp xúc với màng phát quang hóa học (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) cho một hoặc nhiều thời điểm để phát hiện các đoạn lai hóa và để hiển thị chuẩn kích cỡ phân tử. Các màng tiếp theo được hiện ảnh bằng thuốc hiện ảnh màng All-Pro 100 Plus (Konica SRX-101) và hình ảnh được quét để báo cáo. Số lượng và kích cỡ của các dải đã được phát hiện được chứng minh bằng tài liệu cho mỗi đầu phát hiện. Chất đánh dấu khối lượng phân tử ADN được đánh dấu DIG II (MWM DIG II), nhìn thấy được sau khi phát hiện DIG như được mô tả, được sử dụng để xác định kích cỡ đoạn lai hóa trên thấm tách Southern.

Ví dụ 2.6. Tháo đầu phát hiện

Các đầu phát hiện ADN được cất phần nhẹ ra khỏi màng thấm tách sau khi thu được dữ liệu lai hóa Southern, và màng thấm tách có thể được tái sử dụng để lai hóa với đầu phát hiện ADN khác nhau các phương pháp được nhà sản xuất khuyên dùng (DIG Application Manual for Thiết bị lọc Lai hóa, (2003). Roche Diagnostics). Tóm lại, sau khi phát hiện tín hiệu và phơi sáng màng, màng thấm tách được rửa đều bằng nước Milli-Q và tiếp đó là rửa

hai lần trong dung dịch đệm cắt nhẹ (0,2N NaOH, SDS 0,1%) trong khoảng 15 phút ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở 37°C. Màng thấm tách tiếp theo được rửa sơ bộ trong 2xSSC và sẵn sàng để lai hóa sơ bộ và lai hóa với đầu phát hiện ADN khác. Màng thấm tách được tiếp xúc với màng phát quang hóa học mới để đảm bảo toàn bộ các đầu phát hiện ADN được cắt phân nhẹ trước khi tiếp tục lai hóa tiếp theo. Các màng đã được phơi sáng lại được giữ cùng với gói dữ liệu lai hóa trước trong tài liệu nghiên cứu để ghi lại.

Ví dụ 2.7. Kết quả thấm tách Southern

Kích cỡ đoạn mong muốn và quan sát được với phân cắt và đầu phát hiện cụ thể, dựa vào các vị trí enzym giới hạn đã biết của đoạn pDAS1740/Fsp I, được nêu trong bảng 2. Hai dạng đoạn được nhận diện từ các phân cắt và lai hóa này: các đoạn bên trong, tại đó các vị trí enzym đã biết nằm ở sườn bên vùng đầu phát hiện và hoàn toàn chứa trong đoạn pDAS1740/Fsp I và các đoạn biên tại đó vị trí enzym đã biết được định vị ở một đầu của vùng đầu phát hiện và vị trí thứ hai được dự định ở hệ gen của ngô. Kích cỡ đoạn biên thay đổi theo gen bởi vì, trong hầu hết các biến thể gen, vị trí xâm nhập đoạn ADN là duy nhất cho mỗi gen. Các đoạn biên cung cấp phương tiện để định vị vị trí enzym giới hạn so với ADN đã được xâm nhập và đánh giá số lượng các đoạn cài xen ADN. Dựa vào các phân tích thấm tách Southern được hoàn thành trong nghiên cứu này, đã kết luận được rằng một bản sao của AAD-1 PTU nguyên vẹn từ plasmit pDAS1740/Fsp I được cài xen vào hệ gen ngô của biến thể gen DAS-40278-9 như được mô tả chi tiết trong bản đồ cài xen (các Fig. 2-3).

Bảng 2. Các đoạn lai hóa dự đoán và quan sát được trong phân tích thấm tách Southern

Đầu phát hiện ADN	Các enzym giới hạn		Kích cỡ đoạn mong muốn (bp) ¹	Kích cỡ đoạn quan sát được (bp) ²
AAD-1	EcoR I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>3382 (biên)	~12000
	Nco I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không

	<i>Sac</i> I	DAS-40278-9	>2764 (biên)	~4000	
		pDAS1740	8512	8512	
		XHH13	không	không	
		DAS-40278-9	>4389 (biên)	~16000	
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361	
		XHH13	không	không	
		DAS-40278-9	3361	3361	
	ZmUbi1 prom.	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3600*
			XHH13	không	~3600*
DAS-40278-9			>3472 (biên)	~6300, ~3600*	
<i>Sac</i> I		pDAS1740	8512	8512, ~3800*	
		XHH13	không	~3800*	
		DAS-40278-9	>4389 (biên)	~3800*, ~16000	
<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III		pDAS1740	3361	3361, ~6400*	
		XHH13	không	~6400*	
		DAS-40278-9	3361	3361, ~6400*#	

Đầu phát hiện ADN	Các enzym giới hạn		Kích cỡ đoạn mong muốn (bp) ¹	Kích cỡ đoạn quan sát được (bp) ²
ZmPer5 term.	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~3900*
		XHH13	không	~3900*
		DAS-40278-9	>2764 (biên)	~4000, ~3900*
	<i>Sac</i> I	pDAS1740	8512	8512, ~9000*
		XHH13	không	~9000*
		DAS-40278-9	>1847 (biên)	~1900, ~9000*
	<i>Fse</i> I / <i>Hind</i> III	pDAS1740	3361	3361, ~2100*
		XHH13	không	~2100*
		DAS-40278-9	3361	3361, ~2100*
RB7 mar4	<i>Nco</i> I	pDAS1740	8512	8512

		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>2764 (biên) >3472 (biên)	~4000 ~6300
	Sac I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>1847 (biên) >4389 (biên)	~1900 ~16000
RB7 mar3	Nco I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>2764 (biên) >3472 (biên)	~4000 ~6300
	Sac I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	>1847 (biên) >4389 (biên)	~1900 ~16000
khung chính	Nco I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	không	không
	Sac I	pDAS1740	8512	8512
		XHH13	không	không
		DAS-40278-9	không	không

Lưu ý:

* Dấu hoa thị sau kích cỡ đoạn quan sát đã chỉ ra lai hóa trình tự nội sinh được phát hiện ở tất cả các mẫu (bao gồm cả mẫu đối chứng âm tính)

Vạch đôi trong mẫu đối chứng thông thường, BC3S1, và một số mẫu BC3S2

1. Kích cỡ đoạn mong muốn dựa vào bản đồ plasmit của pDAS1740 (pDAB3812) như được thể hiện trong Fig. 1.
2. Kích cỡ đoạn quan sát được xem xét trong khoảng từ các phân tích này và dựa vào kích cỡ đã chỉ ra của các đoạn chất đánh dấu khối lượng phân tử ADN được đánh dấu DIG II. Do sự hợp nhất của phân tử DIG để hiển thị, các đoạn đánh dấu thường chạy khối lượng

phân tử lớn hơn trong khoảng từ 5 đến 10% so với khối lượng phân tử đã chỉ ra thực tế của chúng.

Các enzym giới hạn với vị trí giới hạn duy nhất trong plasmit pDAS1740, *EcoR* I, *Nco* I, *Sac* I, *Fse* I/*Hind* III, được chọn để xác định đặc điểm đoạn cài xen gen *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. đoạn biên > 3382bp, >2764bp, >4389bp được dự đoán lai hóa với đầu phát hiện gen *aad-1* sau khi phân cắt lần lượt *EcoR* I, *Nco* I, và *Sac* I (Bảng 2). Quan sát được một dải lai hóa AAD-1 ~12000bp, ~4000bp, và ~16000bp khi lần lượt *EcoR* I, *Nco* I, và *Sac* I được sử dụng, chỉ ra một vị trí của đoạn cài xen gen *aad-1* ở hệ gen của ngô của biến thể gen DAS-40278-9. Phân cắt kép bằng *Fse* I và *Hind* III được chọn để giải phóng đoạn 3361bp chứa *aad-1* đơn vị bản sao cây (PTU, gen khởi đầu/gen/gen kết thúc) (bảng 2). Quan sát được đoạn 3361bp đã được dự đoán với với đầu phát hiện gen *aad-1* sau phân cắt *Fse* I/*Hind* III. Các kết quả thu được với tất cả bốn phân cắt kết hợp các enzym/enzym của mẫu DAS-40278-9 tiếp đó là lai hóa đầu phát hiện gen *aad-1* đã cho thấy rằng một bản sao của *aad-1* PTU nguyên vẹn từ plasmit pDAS1740 được cài xen vào hệ gen ngô của biến thể gen DAS-40278-9.

Các enzym giới hạn *Nco* I, *Sac* I và *Fse* I/*Hind* III được chọn để xác định đặc điểm vùng trình tự khởi đầu (ZmUbi1) đối với *aad-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. Mong muốn các phân cắt bằng *Nco* I và *Sac* I tạo ra lần lượt các đoạn vùng biên >3472bp và >4389bp, khi được lai hóa với các đầu phát hiện ADN đặc hiệu với vùng trình tự khởi đầu ZmUbi1 (bảng 2). Hai dải lai hóa ~6300bp và ~3600bp được phát hiện với đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 sau khi phân cắt bằng *Nco* I. Dải ~3600bp, tuy nhiên, có mặt trong tất cả các mẫu bao gồm mẫu đối chứng thông thường, cho thấy rằng dải ~3600bp là dải tín hiệu không đặc hiệu thu được từ gắn kết tương đồng của đầu phát hiện trình tự khởi đầu ubiquitin (ZmUbi1) có nguồn gốc từ ngô với gen ubi nội sinh của ngô. Ngược lại, dải tín hiệu ~6300bp được phát hiện trong các mẫu DAS-40278-9 được thử nghiệm chứ không phải trong mẫu đối chứng thông thường, cho thấy rằng dải ~6300bp đặc hiệu với đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 từ plasmit pDAS1740 và vì vậy chính dải *Nco* I/ZmUbi1 đã chỉ ra trong bảng 2. Tương tự, hai dải lai hóa ~3800bp và ~16000bp được phát hiện với đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 sau khi phân cắt bằng *Sac* I. Dải ~3800bp xuất hiện trong tất cả các mẫu bao gồm mẫu đối chứng thông thường và do đó được xem là lai hóa

không đặc hiệu của đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 với gen ubi nội sinh của ngô. Dải lai hóa ~16000bp chỉ có mặt trong các mẫu DAS-40278-9 được xem là dải *Sac I*/ZmUbi1 mong muốn. Phân cắt kép bằng *Fse I*/*Hind III* được dự định để giải phóng đoạn *AAD-1* PTU 3361bp lai hóa với đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 (bảng 2). Dải 3361bp và lai hóa không đặc hiệu dải ~6400bp được phát hiện bằng đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 sau khi phân cắt bằng *Fse I*/*Hind III*. dải ~6400bp được xem là gắn kết không đặc hiệu của đầu phát hiện trình tự khởi đầu ZmUbi1 với gen ubi nội sinh của ngô do dải này có mặt trong tất cả các mẫu bao gồm mẫu đối chứng thông thường. Ngoài ra, quan sát được dải khác rất gần với ~6400bp trong mẫu đối chứng thông thường, BC3S1, và một số mẫu BC3S2. Dải bổ sung này rất gần với ~6400bp cũng được xem là không đặc hiệu vì nó có mặt trong mẫu đối chứng XHH13 thông thường và được kết hợp có khả năng nhất với cơ sở di truyền của XHH13.

Các tổ hợp enzym/enzym giới hạn biến thể gen nhau, *Nco I*, *Sac I* và *Fse I*/*Hind III* được chọn để xác định đặc điểm vùng gen kết thúc (ZmPer5) đối với *AAD-1* trong biến thể gen DAS-40278-9. Phân cắt bằng *Nco I* được dự định để tạo ra đoạn vùng biên >2764bp khi được lai hóa với các đầu phát hiện ADN đặc hiệu với vùng trình tự kết thúc ZmPer5 (bảng 2). Hai dải lai hóa ~4000bp và ~3900bp được phát hiện với đầu phát hiện trình tự kết thúc ZmPer5 sau khi phân cắt bằng *Nco I*. Dải ~3900bp có mặt trong tất cả các mẫu bao gồm mẫu đối chứng thông thường, cho thấy rằng dải ~3900bp là tín hiệu không đặc hiệu dải chắc chắn là do gắn kết tương đồng với đầu phát hiện gen kết thúc có gen peroxidaza nguồn gốc từ ngô (ZmPer5) với gen per nội sinh của ngô. Ngược lại, dải tín hiệu ~4000bp được phát hiện trong mẫu DAS-40278-9 được thử nghiệm chứ không phải trong mẫu đối chứng thông thường, cho thấy rằng dải đặc hiệu ~4000bp với đầu phát hiện trình tự kết thúc ZmPer5 từ plasmit pDAS1740 và vì vậy chính dải *Nco I*/ZmPer5 mong muốn đã chỉ ra trong bảng 2. Đoạn biên >1847bp được dự định để lai hóa với đầu phát hiện trình tự kết thúc ZmPer5 sau khi phân cắt bằng *Sac I*. Hai dải lai hóa ~1900bp và ~9000bp được phát hiện với đầu phát hiện trình tự kết thúc ZmPer5 sau khi phân cắt bằng *Sac I*. Dải ~9000bp xuất hiện trong tất cả các mẫu bao gồm mẫu đối chứng thông thường và do đó được xem là lai hóa không đặc hiệu của đầu phát hiện trình tự kết thúc ZmPer5 với gen per nội sinh của ngô. Dải lai hóa ~1900bp chỉ có mặt trong các mẫu DAS-40278-9 được xem là dải *Sac I*/ZmPer5 mong muốn. Phân cắt kép bằng *Fse I*/*Hind III* được dự định để giải phóng đoạn

AAD-1 PTU 3361bp lai hóa với đầu phát hiện trình tự kết thúc *ZmPer5* (bảng 2). Dải 3361bp này và dải lai hóa không đặc hiệu bổ sung ~2100bp được phát hiện bằng đầu phát hiện trình tự kết thúc *ZmPer5* sau khi phân cắt bằng *Fse I/Hind III*. Dải ~2100bp bổ sung được gắn kết không đặc hiệu đầu phát hiện trình tự kết thúc *ZmPer5* với gen nội sinh của ngô do dải này có mặt trong tất cả các mẫu bao gồm mẫu đối chứng âm tính. Các kết quả thu được với các phân cắt này của mẫu DAS-40278-9 tiếp đó là trình tự khởi đầu *ZmUbi1* và lai hóa đầu phát hiện trình tự kết thúc *ZmPer5* đã khẳng định tiếp rằng một bản sao của *aad-1* PTU nguyên vẹn từ plasmid pDAS1740 được cài xen vào hệ gen ngô của biến thể gen DAS-40278-9.

Các enzym giới hạn, *Nco I* và *Sac I*, được chọn để xác định đặc điểm phần còn lại của các thành phần này từ đoạn pDAS1740/*Fsp I* ở biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9 (bảng 2). Trình tự ADN của các thành phần RB7 Mar v3 và RB7 Mar v4 có mức tương đồng lớn hơn 99,7%, vì vậy các đầu phát hiện ADN đặc hiệu cho RB7 Mar v3 hoặc RB7 Mar v4 được mong muốn để lai hóa với các đoạn ADN chứa phiên bản RB7 Mar. Hai đoạn biên >2764bp và >3472bp được mong muốn để lai hóa với các đầu phát hiện RB7 Mar v4 và RB7 Mar v3 sau khi phân cắt bằng *Nco I* (bảng 2). Quan sát được hai dải lai hóa ~4000bp và ~6300bp với đầu phát hiện RB7 Mar v4 hoặc RB7 Mar v3 sau khi phân cắt bằng *Nco I* trong các mẫu DAS-40278-9. Tương tự, hai các đoạn biên >1847bp và >4389bp được dự đoán với các đầu phát hiện RB7 Mar v4 và RB7 Mar v3 sau khi phân cắt bằng *Sac I* (bảng 2). Các dải lai hóa ~1900bp và ~16000bp được phát hiện trong các mẫu DAS-40278-9 với đầu phát hiện RB7 Mar v4 hoặc RB7 Mar v3 sau khi phân cắt bằng *Sac I*.

Khi được thực hiện cùng nhau, các kết quả lai hóa Southern thu được với các đầu phát hiện cơ bản này đã cho thấy rằng ADN được cài xen ở biến thể gen ngô DAS-40278-9 chứa *AAD-1* PTU nguyên vẹn cùng với các vùng dính với chất nền RB7 Mar v3 và RB7 Mar v4 ở lần lượt các đầu 5' và 3' của đoạn cài xen.

Ví dụ 2.8. Sự không có mặt của trình tự khung chính

Kết hợp tỷ lệ phân tử gam bằng nhau của ba đoạn ADN (bảng 1) phủ gần như toàn bộ vùng khung chính *Fsp I* (4867-7143bp trong plasmid pDAS1740) của plasmid pDAS1740 được sử dụng làm đầu phát hiện khung chính để xác định đặc điểm biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9. Plasmid đoạn pDAS1740/*Fsp I* được sử dụng để tạo ra biến

thể gen DAS-40278-9, vì vậy, không có tín hiệu lai hóa đặc hiệu được mong muốn với tổ hợp đầu phát hiện khung chính (bảng 2) sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn bất kỳ. Đã khẳng định được rằng không có tín hiệu lai hóa đặc hiệu được phát hiện với đầu phát hiện khung chính sau khi phân cắt bằng *Nco* I hoặc *Sac* I trong tất cả các mẫu DAS-40278-9. Các dãy đối chứng dương tính chứa các dải lai hóa mong muốn đã chứng minh được rằng các đầu phát hiện có khả năng lai hóa với các đoạn ADN tương đồng bất kỳ nếu có mặt trong các mẫu. Các dữ liệu này đã đưa ra giả thuyết rằng đoạn cài xen ở biến thể gen ngô DAS-40278-9 không bao gồm bất kỳ trình tự khung chính của vật truyền ngoài vùng *Fsp* I từ plasmit pDAS1740.

Các mẫu lá từ năm thế hệ riêng biệt của biến thể gen DAS-40278-9 được sử dụng để thực hiện phân tích thẩm tách Southern để xác định đặc điểm phân tử. Kiểu xâm nhập được nghiên cứu bằng cách sử dụng kết hợp đầu phát hiện và phân cắt bằng enzym giới hạn được chọn để xác định đặc điểm gen đã được cài xen, *aad-1*, cũng như các vùng không mã hóa bao gồm trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc của biểu hiện gen, và các vùng dính với chất nền.

Xác định đặc điểm thẩm tách Southern của ADN được cài xen vào biến thể gen DAS-40278-9 cho thấy rằng một bản sao nguyên vẹn của *AAD-1* PTU đã được xâm nhập vào biến thể gen DAS-40278-9. Khối lượng phân tử đã chỉ ra bởi lai hóa Southern để kết hợp enzym giới hạn và đầu phát hiện là duy nhất cho biến thể gen này, và thiết lập kiểu nhận diện nó. Kiểu lai hóa là biến thể gen nhau ở cả năm thế hệ, cho thấy rằng cài xen là ổn định ở hệ gen của ngô. Lai hóa với các đầu phát hiện phủ vùng khung chính cách đoạn biến nạp pDAS1740/*Fsp* I từ plasmit pDAS1740 khẳng định rằng không có trình tự khung chính vật truyền được đưa vào trong biến thể gen DAS-40278-9.

Ví dụ 3. Tách dòng vô tính và xác định đặc điểm trình tự ADN ở vùng cài xen và vùng biên nằm ở sườn bên của biến thể gen ngô DAS-40278-9

Để xác định đặc điểm ADN đã được cài xen và mô tả hệ gen vị trí đoạn cài xen, trình tự ADN của các vùng cài xen và vùng biên của biến thể gen DAS-40278-9 được xác định. Tổng số 8557bp của biến thể gen trình tự hệ gen DAS-40278-9 được xác nhận, bao gồm 1873bp trình tự biên nằm ở sườn bên 5', 1868bp trình tự biên nằm ở sườn bên 3', và 4816bp đoạn cài xen ADN. 4816bp đoạn cài xen ADN chứa catxet biểu hiện *AAD-1* nguyên vẹn, 259bp một phần MAR v3 trên đầu tận cùng 5', và 1096bp một phần MAR v4

trên đầu tận cùng 3'. Phân tích trình tự cho thấy 21bp đoạn cài xen ở phần nối xâm nhập 5' và khuyết đoạn hai cặp bazơ từ locut cài xen của hệ gen ngô. Đã phát hiện ra một cặp bazơ đoạn cài xen ở đoạn xâm nhập 3' giữa hệ gen ngô và đoạn cài xen DAS-40278-9. Ngoài ra, đã phát hiện ra sự thay đổi một bazơ (T thành C) trong đoạn cài xen ở vị trí 5212 trong vùng không mã hóa của 3' UTR. Các thay đổi này không làm ảnh hưởng đến thành phần khung đọc mở của catxet biểu hiện *AAD-1*.

Sự khuếch đại PCR dựa vào biến thể gen đoạn cài xen DAS-40278-9 và trình tự biên đã khẳng định rằng các vùng biên có nguồn gốc ngô và vùng nối có thể được sử dụng để xác định đặc hiệu gen của DAS-40278-9. Phân tích về trình tự kéo dài vùng nối đã cho thấy rằng không có các khung đọc mở mới (ORF >= 200 codon) thu được từ đoạn cài xen ADN trong biến thể gen DAS-40278-9 và cũng không có các khung đọc mở hệ gen bị ngắt bởi sự xâm nhập DAS-40278-9 trong hệ gen ngô nguyên thể. Nói chung, việc xác định đặc điểm của trình tự cài xen và trình tự biên của biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9 đã cho thấy rằng một bản sao nguyên vẹn của cat-xét biểu hiện *AAD-1* được xâm nhập vào hệ gen ngô nguyên thể.

Ví dụ 3.1. Chiết và định lượng ADN hệ gen

ADN hệ gen được chiết từ các mô lá tươi hoặc đông khô nhanh bằng cách sử dụng phương pháp CTAB cải biến. Mẫu ADN được hoà tan trong 1× TE (10mM Tris độ pH 8,0, 1mM EDTA) (Fluka, Sigma, St. Louis, MO) và được xác định phương pháp Pico Green theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Phân tử các đầu phát hiện, Eugene, HOẶC). Để phân tích PCR, mẫu ADN được pha loãng bằng nước đạt chuẩn sinh học phân tử (5 PRIME, Gaithersburg, MD) để thu được nồng độ 10-100ng/uL.

Ví dụ 3.2. Đoạn môi PCR

Bảng 3 liệt kê trình tự đoạn môi được sử dụng để tách dòng vô tính đoạn cài xen ADN và các vùng biên nằm ở sườn bên của biến thể gen DAS-40278-9, với các vị trí và phân mô tả được đánh dấu trong Fig. 4. Bảng 4 liệt kê trình tự đoạn môi được sử dụng để khẳng định trình tự cài xen và trình tự biên. Các vị trí đoạn môi được đánh dấu trong lần lượt các Fig. 4 và 5. Tất cả các đoạn môi được tổng hợp bởi Intergated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). Đoạn môi được hoà tan trong nước (5 PRIME, Gaithersburg, MD) đến nồng độ 100µM đối với dung dịch gốc và được pha loãng bằng nước đến nồng độ 10µM đối với dung dịch làm việc.

Bảng 3. Danh mục trình tự đoạn nối được sử dụng để tách dòng vô tính đoạn cài xen ở biến thể gen ngô DAS-40278-9 và trình tự biên nằm ở sườn bên

Tên đoạn nối	Kích cỡ (bp)	Định vị (bp)	Trình tự	Mục đích
5End3812_A	26	2231-2256 (-)	SEQ ID NO: 1: 5' – TGCACTGCAGGTCGACT CTAGAGGAT – 3'	PCT sơ cấp cho trình tự biên 5'
5End3812_B	23	2110-2132 (-)	SEQ ID NO: 2: 5' – GCGGTGGCáCACTATT TTCAGAAG – 3'	PCR thứ cấp cho trình tự biên 5'
3End3812_C	26	5535-5560 (+)	SEQ ID NO: 3: 5' – TTGTTACGGCATATAT CCAATAGCGG – 3'	PCT sơ cấp cho trình tự biên 3'
3End3812_D	26	5587-5612 (+)	SEQ ID NO: 4: 5' – CCGTGGCCTATTTTCA GAAGAAGTTC – 3'	PCR thứ cấp cho trình tự biên 3'
Amp 1F	23	736-758 (+)	SEQ ID NO: 5: 5' – ACAACCATATTGGCTT TGGCTGA – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 1, được sử dụng với Amp 1R
Amp 2F	23	1696-1718 (+)	SEQ ID NO: 7: 5' – CTCCATTCAGGAGACC TCGCTTG – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 2, được sử dụng với Amp 2R
Amp 2R	23	3376-3398 (-)	SEQ ID NO: 8: 5' – GTACAGGTCGCATCCG TGTACGA – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm

				khuếch đại 2, được sử dụng với Amp 2F
Amp 3F	25	3254-3278 (+)	SEQ ID NO: 9: 5' – CCCCCCTCTCTACCTT CTCTAGAT – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 3, được sử dụng với Amp 3R
Amp 3R	23	4931-4953 (-)	SEQ ID NO: 10: 5' – GTCATGCCCTCAATTC TCTGACA – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 3, được sử dụng với Amp 3F
Amp 4F	23	4806-4828 (+)	SEQ ID NO: 11: 5' – GTCGCTTCAGCAACAC CTCAGTC – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 4, được sử dụng với Amp 4R
Amp 4R	23	6767-6789 (-)	SEQ ID NO: 12: 5' – AGCTCAGATCAAAGA CACACCCC – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 4, được sử dụng với Amp 4F
Amp 5F	28	6300-6327 (+)	SEQ ID NO: 13: 5' – TCGTTTGACTAATTTT TCGTTGATGTAC – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 5,

				được sử dụng với Amp 5R
Amp 5R	23	7761-7783 (-)	SEQ ID NO: 14: 5' – TCTCACTTTCGTGTCA TCGGTCG – 3'	Khuếch đại đoạn cài xen, Sản phẩm khuếch đại 5, được sử dụng với Amp 5F

(+): Trình tự trực tiếp;

(-): Trình tự bổ sung;

Bảng 4. Danh mục trình tự đoạn môi được sử dụng trong xác nhận ADN hệ gen của ngô

Tên đoạn môi	Kích cỡ (bp)	Định vị (bp)	Trình tự	Mục đích
1F5End01	17	1816- 1832 (+)	SEQ ID NO: 15: 5' – CCAGCACGAACCATTTGA – 3'	xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với AI5End01
1F5End02	24	1629- 1652 (+)	SEQ ID NO: 16: 5' – CGTGTATATAAGGTCCAGA GGGTA – 3'	xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với AI5End02
AI5End01	17	4281- 4297 (-)	SEQ ID NO: 17: 5' – TTGGGAGAGAGGGCTGA – 3'	xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với 1F5End01
AI5End02	20	4406- 4426 (-)	SEQ ID NO: 18: 5' – TGGTAAGTGTGGAAGGCAT C – 3'	xác nhận ADN hệ gen biên 5', được sử dụng với 1F5End02

1F3End03	20	8296-8315 (-)	SEQ ID NO: 19: 5' – GAGGTACAACCGGAGCGTT T– 3'	xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F5End03
1F3End04	19	8419-8437 (-)	SEQ ID NO: 20: 5' – CCGACGCTTTTCTGGAGTA– 3'	xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F5End04
1F5End03	22	378-399 (+)	SEQ ID NO: 21: 5' – TGTGCCACATAATCACGTA ACA– 3'	xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F3End03
1F5End04	20	267-286 (+)	SEQ ID NO: 22: 5' – GAGACGTATGCGAAAATTC G– 3'	xác nhận ADN hệ gen, được sử dụng với 1F3End04
AI3End01	22	4973-4994 (+)	SEQ ID NO: 23: 5' – TTGCTTCAGTTCCTCTATGA GC– 3'	xác nhận ADN hệ gen biên 3', được sử dụng với 1F3End05
1F3End05	19	7060-7078 (-)	SEQ ID NO: 24: 5' – TCCGTGTCCACTCCTTTGT– 3'	xác nhận ADN hệ gen biên 3', được sử dụng với AI3End01
1F5EndT1F	22	2033-2054 (-)	SEQ ID NO: 25: 5' – GCAAAGGAAACTGCCATT CTT– 3'	trình tự khuếch đại đặc hiệu 278 ở đoạn nối 5'
1F5EndT1R	20	1765-1784 (+)	SEQ ID NO: 26: 5' – TCTCTAAGCGGCCCAAATT – 3'	trình tự khuếch đại đặc hiệu 278 ở

				đoạn nối 5'
Corn278-F	23	1884- 1906 (-)	SEQ ID NO: 27: 5' – ATTCTGGCTTTGCTGTAAAT CGT– 3'	trình tự khuếch đại đặc hiệu 278 ở đoạn nối 5'
Corn278-R	24	1834- 1857 (+)	SEQ ID NO: 28: 5' – TTACAATCAACAGCACCGT ACCTT– 3'	trình tự khuếch đại đặc hiệu 278 ở đoạn nối 5'

(+): Trình tự trực tiếp;

(-): Trình tự bổ sung;

Ví dụ 3.3. Phương pháp đi dọc hệ gen

Kit GenomeWalker™ Universal (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) được sử dụng để tách dòng vô tính trình tự biên 5' và 3' của biến thể gen ngô DAS-40278-9. Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, khoảng 2,5µg ADN hệ gen từ biến thể gen ngô AAD-1 DAS-40278-9 được phân cắt qua đêm bằng *EcoR* V, *Stu* I (cả hai đều được cấp bởi kit) hoặc *Sca* I (New England Biolabs, Ipswich, MA). ADN đã được phân cắt được tinh chế bằng cách sử dụng DNA Clean & Concentrator™-25 (ZYMO Research, Orange, CA) tiếp đó là nối với gen thích ứng GenomeWalker™ để cấu trúc các thư viện GenomeWalker™. Mỗi thư viện GenomeWalker™ được sử dụng làm khuôn mẫu ADN để khuếch đại PCR sơ cấp với đoạn môi gen thích ứng AP1, được cung cấp trong kit, và mỗi đoạn môi đặc hiệu cấu trúc 5End3812_A và 3End3812_C. Tỷ lệ pha loãng một microlit 1:25 của phản ứng PCT sơ cấp tiếp theo được sử dụng làm khuôn mẫu để khuếch đại PCR thứ cấp với đoạn môi gen thích ứng đã được xếp AP2 và mỗi đoạn môi đặc hiệu cấu trúc đã được xếp 5End3812_B và 3End3812_D. TaKaRa LA Taq™ HS (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) được sử dụng trong khuếch đại PCR. Trong 50µL phản ứng PCR, 1µL khuôn mẫu ADN, 8µL của 2,5mM hỗn hợp dNTP, 0,2µM mỗi đoạn môi, 2,5 đơn vị TaKaRa LA Taq™ HS ADN Polymeaza, 5µl 10xLA dung dịch đệm PCR II (Mg2+plus), và 1,5µL 25mM MgCl₂ được sử dụng. Các điều kiện PCR đặc hiệu được nêu trong bảng 5.

Bảng 5. Các điều kiện cho phương pháp đi dọc hệ gen của biến thể gen ngô *aad-1* DAS-40278-9 để phóng đại các vùng biên nằm ở sườn bên

Trình tự đích	Bộ đoạn mỗi	Biến tính sơ bộ (°C /phút)	Biến tính (°C /giây)	Ghép (°C/giây)	Kéo dài (°C/phút:giây)	Biến tính (°C /giây)	Ghép (°C /giây)	Kéo dài (°C /phút:giây)	Kéo dài cuối (°C /phút)
biên 5'	5End3812_A/ AP1	95/3	95/30	68 ^{-0,5/vòng} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 vòng			22 vòng			
biên 5' (đã lỏng)	5End3812_B/ AP2	95/3	95/30	68 ^{-0,5/vòng} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 vòng			22 vòng			
biên 3'	3End3812_C/ AP1	95/3	95/30	68 ^{-0,5/vòng} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 vòng			22 vòng			
biên 3' (đã lỏng)	3End3812_D/ AP2	95/3	95/30	68 ^{-0,5/vòng} →64 /30	68/10:00	95/30	64/30	68/10:00	72/10
			8 vòng			22 vòng			

Ví dụ 3.4. PCR thông thường

PCR chuẩn được sử dụng để tách dòng vô tính và xác nhận đoạn cài xen ADN và trình tự biên ở biến thể gen ngô DAS-40278-9. TaKaRa LA Taq™ (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), HotStarTaq ADN Polymeaza (Qiagen, Valencia, CA), Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Inc., Indianapolis, IN), hoặc the Easy-A® High-Fidelity PCR Cloning Enzyme & Master Mix (Stratagene, LaJolla, CA) được sử dụng cho các phương pháp khuếch đại PCR thông thường được nhà sản xuất khuyến dùng. Phần mô tả các điều kiện PCR đặc hiệu và sản phẩm khuếch đại được nêu trong bảng 6.

Bảng 6. Các điều kiện để khuếch đại PCR chuẩn các vùng biên ở biến thể gen ngô DAS-40278-9

Trình tự đích	Bộ đoạn mỗi	Biến tính sơ bộ (°C/phút)	Biến tính (°C/giây)	Ghép (°C/giây)	Kéo dài (°C/phút:giây)	Kéo dài cuối (°C/phút)
Biên 5'	1F5End01/ AI5End01	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 vòng			
Biên 5'	1F5End02/ AI5End02	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 vòng			
Qua locut cài xen	1F3End03/ 1F5End03	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 vòng			
Qua locut cài xen	1F3End04/ 1F5End04	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 vòng			
phần nối 5' (Sản phẩm khuếch đại 1)	Amp 1F/ Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 vòng			
Sản	Amp 1F/	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10

phẩm khuếch đại 2	Amp 1R		35 vòng			
Sản phẩm khuếch đại 3	Amp 1F/ Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 vòng			
Sản phẩm khuếch đại 4	Amp 1F/ Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 vòng			
phần nối 3' (Sản phẩm khuếch đại 5)	Amp 1F/ Amp 1R	95/2	94/60	55/60	72/2:00	72/10
			35 vòng			
Biên 3'	1F3End05/ AI3End01	95/3	95/30	60/30	68/5:00	72/10
			35 vòng			

Ví dụ 3.5. Phát hiện sản phẩm PCR, tinh chế, tách dưới dòng vô tính sản phẩm PCR, và sắp xếp trình tự

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di bằng cách sử dụng E-gel 1,2% hoặc 2% (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kích cỡ đoạn được ước tính bằng cách so sánh với gen đánh dấu ADN. Nếu cần, các đoạn PCR được tinh chế bằng cách cắt các đoạn từ gel agarosa 1% trong 1× TBE được nhuộm ethidi bromua, bằng cách sử dụng kit chiết gel QIAquick (Qiagen, Carlsbad, CA).

Các đoạn PCR được tách dưới dòng vô tính vào pCR[®]4-TOPO[®] bằng cách sử dụng kit TOPO TA Cloning[®] để sắp xếp trình tự (Invitrogen, Carlsbad, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đặc biệt, từ hai đến năm microlit dung dịch phản ứng tách dòng vô tính TOPO[®] được biến nạp vào các tế bào TOP10 khả biến hóa học One Shot theo hướng dẫn

của nhà sản xuất. Các đoạn đã được tách dòng vô tính được kiểm tra bằng cách điều chế lượng nhỏ ADN plasmid (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Carlsbad, CA) tiếp đó là phân cắt giới hạn bằng *EcoR* I hoặc bằng PCR khuôn lạc trực tiếp bằng cách sử dụng các đoạn mồi T3 và T7, được cung cấp trong kit. Các kho ADN plasmid hoặc glyxerol của khuôn lạc đã được chọn tiếp theo được gửi để sắp xếp trình tự.

Sau khi tách dưới dòng vô tính, các sản phẩm PCR đích giả định được sắp xếp trình tự vào lúc đầu để khẳng định rằng các đoạn ADN mong muốn đã được tách dòng vô tính. Các khuôn lạc chứa trình tự ADN được chọn thích hợp để đi dọc đoạn mồi để xác định trình tự ADN hoàn chỉnh. Sắp xếp trình tự được thực hiện bởi Cogenics (Houston, TX).

Tập hợp cuối gồm trình tự biên và trình tự cài xen được hoàn thành bằng cách sử dụng phần mềm Sequencher (Phiên bản 4,8 Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI). Chú thích về trình tự cài xen và trình tự biên của biến thể gen ngô DAS-40278-9 được thực hiện bằng cách sử dụng vật truyền NTI (Phiên bản 10 và 11, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tra cứu sự tương đồng được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLAST với cơ sở dữ liệu GenBank. Phân tích khung đọc mở (ORF) bằng cách sử dụng vật truyền NTI (Phiên bản 11, Invitrogen) được thực hiện để xác định các ORF (≥ 200 codon) trong trình tự biên nằm ở sườn bên và trình tự cài xen hoàn chỉnh.

Ví dụ 3.6. Trình tự biên đầu 5'

Đoạn ADN được khuếch đại từ mỗi thư viện biến thể gen ngô DAS-40278-9 GenomeWalker™ bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi được xếp đặc hiệu cho đầu 5' của gen chuyển. Khoảng 800 bp sản phẩm PCR quan sát được từ cả thư viện biến thể gen DAS-40278-9 *EcoR* V và *Stu* I GenomeWalker™. Thư viện *Sca* I GenomeWalker™ tạo ra sản phẩm gần 2 kb. Các đoạn được tách dòng vô tính vào pCR® 4-TOPO® và sáu khuôn lạc từ mỗi thư viện được chọn một cách ngẫu nhiên cho sắp xếp trình tự cuối để khẳng định đoạn cài xen chứa trình tự mong muốn. Sắp xếp trình tự hoàn chỉnh bằng phương pháp đi dọc đoạn mồi các đoạn cài xen cho thấy các đoạn được khuếch đại từ các thư viện biến thể gen ngô DAS-40278-9 *Stu* I, *EcoR* V, và *Sca* I GenomeWalker™ lần lượt là 793, 822, và 2132bp. Các đoạn ADN tạo ra từ thư viện *Stu* I và *EcoR* V GenomeWalker™ là khớp 100% với đoạn ADN tạo ra từ thư viện *Sca* I GenomeWalker™, cho thấy rằng các đoạn ADN này được khuếch đại từ vùng 5' của đoạn cài xen gen chuyển. Tra cứu BLAST về trình tự hệ gen 1873bp thu được của ngô đã chỉ ra mức tương tự cao với trình tự của dòng

vô tính BAC của ngô. Ngoài ra, phân tích trình tự về đoạn nối cài xen đã cho thấy rằng 917bp của MAR v3 ở vùng đầu 5' của nó được làm cùn được so với đoạn plasmit pDAS1740/*Fsp* I, thu được 259bp một phần MAR v3 ở vùng 5' của catxet biểu hiện AAD-1.

Ví dụ 3.7. Trình tự biên đầu 3'

Đoạn ADN với kích cỡ khoảng 3kb được khuếch đại từ thư viện biến thể gen ngô DAS-40278-9 *Stu* I GenomeWalker™ bằng cách sử dụng bộ đoạn môi được xếp đặc hiệu cho đầu 3' của gen chuyển. Đoạn ADN được tách dòng vô tính vào pCRđ®-TOPO® và mười khuẩn lạc được chọn một cách ngẫu nhiên để sắp xếp trình tự cuối để khẳng định đoạn cài xen của trình tự mong muốn. Ba dòng vô tính với các đoạn cài xen mong muốn được sắp xếp trình tự hoàn chỉnh, tạo ra đoạn ADN 2997bp. Phân tích trình tự về đoạn ADN này cho thấy một phần yếu tố MAR v4 (thiếu 70bp vùng 5' của nó) và 1867bp trình tự hệ gen của ngô. Tra cứu BLAST cho thấy trình tự hệ gen ADN 1867bp khớp 100% với trình tự trong cùng dòng vô tính BAC của ngô như được nhận diện với trình tự biên 5'.

Ví dụ 3.8. Đoạn cài xen ADN và trình tự nối

Đoạn cài xen ADN và vùng nối đã được tách dòng vô tính từ biến thể gen ngô DAS-40278-9 bằng cách sử dụng các phương pháp trên cơ sở PCR như được mô tả trước đó. Năm cặp đoạn môi được thiết kế dựa vào trình tự biên 5' và 3' và trình tự gen chuyển mong muốn. Tổng số năm đoạn ADN chồng lợp lên (Sản phẩm khuếch đại 1 là 1767bp, sản phẩm khuếch đại 2 là 1703bp, sản phẩm khuếch đại 3 là 1700bp, sản phẩm khuếch đại 4 là 1984bp, và sản phẩm khuếch đại 5 là 1484bp) đã được tách dòng vô tính và sắp xếp trình tự (Fig. 4). Các trình biên nằm ở sườn bên và trình tự cài xen nguyên vẹn được tập hợp dựa vào trình tự chồng lợp lên trong số năm đoạn. Trình tự cuối xác nhận sự có mặt của 4816bp của đoạn cài xen ADN có nguồn gốc từ pDAS1740/*Fsp* I, 1873bp của trình tự biên nằm ở sườn bên 5', và 1868bp của trình tự biên nằm ở sườn bên 3'. Đoạn cài xen ADN chứa catxet biểu hiện AAD-1 nguyên vẹn 4816bp, 259bp một phần MAR v3 trên đầu tận cùng 5', và 1096bp một phần MAR v4 trên đầu tận cùng 3' (SEQ ID NO: 29).

Ít nhất hai dòng vô tính cho mỗi cặp đoạn môi được sử dụng để đi dọc đoạn môi để thu được trình tự thông tin hoàn chỉnh trên đoạn cài xen ADN và trình tự biên của nó. Phân tích trình tự đã chỉ ra 21bp đoạn cài xen ở phần nối xâm nhập 5' giữa ADN hệ gen của ngô và một phần MAR v3 đã được xâm nhập từ pDAS1740/*Fsp* I. Các kết quả tra cứu

BLAST và phân tích vật truyền NTI đã cho thấy rằng 21bp ADN cài xen không chứng minh được sự tương đồng với ADN hoặc pDAS1740 ADN plasmit loài cây bất kỳ. Cài xen một cặp bazơ đã phát hiện ra ở đoạn nối xâm nhập 3' giữa ADN hệ gen của ngô và một phần MAR v4 từ pDAS1740/*Fsp* I. ADN xâm nhập cũng dẫn đến việc khuyết đoạn hai cặp bazơ ở locut cài xen của hệ gen ngô (Fig. 6). Ngoài ra, quan sát được một sự sai khác nucleotit (T thành C) ở vị trí 5212bp trong vùng 3' UTR không được phiên mã của đoạn cài xen ADN (SEQ ID NO: 29). Tuy nhiên, các thay đổi này dường như không quan trọng đối với sự biểu hiện AAD-1 hoặc tạo ra các ORF mới bất kỳ (≥ 200 codon) qua phân nối trong đoạn cài xen của DAS-40278-9.

Ví dụ 3.9. Xác nhận trình tự hệ gen của ngô

Để khẳng định vị trí đoạn cài xen của biến thể gen gen chuyển DAS-40278-9 ở hệ gen của ngô, khuếch đại PCR được thực hiện với các cặp đoạn mỗi khác nhau (Fig. 4). ADN hệ gen từ biến thể gen DAS-40278-9 và các dòng ngô chuyển gen hoặc không chuyển gen khác được sử dụng làm khuôn mẫu. Hai đoạn mỗi đặc hiệu *AAD-1*, AI5End01 và AI5End02, và hai đoạn mỗi được thiết kế theo trình tự biên đầu 5', 1F5End01 và 1F5End02, được sử dụng để phóng đại các đoạn ADN kéo dài gen *AAD-1* đến trình tự biên đầu 5'. Tương tự, để phóng đại đoạn ADN kéo dài *AAD-1* đến trình tự biên đầu 3', đoạn mỗi 1F3End05 có nguồn gốc từ trình tự biên đầu 3' và đoạn mỗi AI3End01 đặc hiệu *AAD-1* được sử dụng. Các đoạn ADN với kích cỡ mong muốn được khuếch đại chỉ từ ADN hệ gen của biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9, với mỗi cặp đoạn mỗi chứa một đoạn mỗi nằm trên biên nằm ở sườn bên của biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9 và một đoạn mỗi đặc hiệu *AAD-1*. Mẫu ADN đối chứng không tạo ra sản phẩm PCR với cùng cặp đoạn mỗi cho thấy rằng trình tự biên đầu 5' và 3' đã được tách dòng vô tính lần lượt là trình tự nằm phía dưới và trình tự nằm phía trên của cấu trúc gen *AAD-1* gen đã được cài xen. Lưu ý rằng dải nhạt màu với kích cỡ khoảng 8kb quan sát được trong toàn bộ các mẫu ngô bao gồm biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9, *AAD-1* biến thể gen ngô DAS-40474 và dòng ngô không chuyển gen XHH13 khi cặp đoạn mỗi 1F5End01 và AI5End01 được sử dụng để khuếch đại PCR. Dải nhạt màu quan sát được (trên gel đã được điều chế) có thể là kết quả của khuếch đại không đặc hiệu trong hệ gen ngô với các cặp đoạn mỗi này.

Để xác nhận tiếp đoạn cài xen ADN ở hệ gen của ngô, hai đoạn mỗi được định vị ở trình tự biên đầu 5', 1F5End03 và 1F5End04, và hai đoạn mỗi được định vị ở trình tự biên

đầu 3', 1F3End03 và 1F3End04, được sử dụng để phóng đại các đoạn ADN kéo dài locut cài xen. Sự khuếch đại PCR với cặp đoạn mỗi 1F5End03/1F3End03 hoặc cặp đoạn mỗi 1F5End04/1F3End04 dẫn đến đoạn với kích cỡ mong muốn khoảng 8 kb từ ADN hệ gen của biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9. Trái lại, không thu được sản phẩm PCR từ ADN hệ gen của *AAD-1* biến thể gen ngô DAS-40474-7 hoặc dòng ngô không chuyển gen XHH13. Bởi vì biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9 và biến thể gen DAS-40474-7 được tạo ra bằng biến nạp HiII, tiếp đó là lai chéo ngược biến thể gen chuyển gen ban đầu với dòng ngô XHH13, phần lớn hệ gen trong mỗi biến thể gen trong hai biến thể gen này về lý thuyết là từ dòng ngô XHH13. Có khả năng là chỉ có trình tự biên nằm ở sườn bên gần với gen chuyển *AAD-1* được mang qua từ ADN hệ gen ban đầu và được bảo toàn trong suốt quá trình lai nhập gen *AAD-1*, trong khi các vùng khác của trình tự hệ gen có thể đã được thay thế bằng trình tự hệ gen của XHH13. Vì vậy, không ngạc nhiên rằng no các đoạn được khuếch đại từ ADN hệ gen của *AAD-1* biến thể gen ngô DAS-40474-7 và XHH13 với cặp đoạn mỗi 1F5End03/1F3End03 hoặc cặp đoạn mỗi 1F5End04/1F3End04. Các đoạn được khuếch đại khoảng 3,1 và 3,3kb với lần lượt các cặp đoạn mỗi 1F5End03/1F3End03 và 1F5End04/1F3End04 trong ADN hệ gen của các dòng ngô HiII và B73 chứ không phải trong dòng ngô A188. Các kết quả cho thấy rằng trình tự biên có nguồn gốc từ hệ gen của dòng ngô B73.

Tách dòng vô tính bổ sung ADN hệ gen của ngô từ B73/HiII được thực hiện để đảm bảo tính hợp lệ của trình tự biên nằm ở sườn bên. Các đoạn PCR được khuếch đại được sắp xếp trình tự để chứng minh vùng cài xen ADN đã xâm nhập vào vị trí đặc hiệu của ADN hệ gen B73/HiII. Các đoạn mỗi được thiết kế dựa vào trình tự thu được. Bộ đoạn mỗi Amp 1F/Amp 5R được sử dụng để phóng đại đoạn 2212bp kéo dài đầu 5' đến phần nối của 3' từ hệ gen B73/HiII nguyên thể mà không có ADN cài xen. Phân tích trình tự cho thấy có khuyết đoạn hai cặp bazơ từ hệ gen B73 nguyên thể trong locut cài xen gen chuyển. Phân tích về trình tự ADN từ đoạn hệ gen B73 nguyên thể đã được tách dòng vô tính đã nhận diện một ORF (≥ 200 codon) định vị ở phía dưới của vùng nối xâm nhập 3'. Ngoài ra, không có các ORF khác chéo qua locut ban đầu mà tại đó biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9 được xâm nhập. Tra cứu BLAST cũng đã khẳng định rằng cả trình tự biên đầu 5' và đầu 3' từ biến thể gen DAS40278-9 được định vị cạnh nhau trên cùng dòng vô tính BAC của ngô.

Tính duy nhất của đoạn nối xâm nhập 5' của biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9, hai cặp đoạn mồi PCR đặc hiệu, 1F5EndT1F/1F5EndT1R và Corn278-F/Corn278-R, được thiết kế để phóng đại đoạn nối hệ gen cài xen đến cây này. Như đã dự đoán, đoạn ADN mong muốn chỉ được tạo ra trong ADN hệ gen của biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9 chứ không phải trong các dòng ngô chuyển gen hoặc không chuyển gen khác bất kỳ. Vì vậy, hai cặp đoạn mồi đó có thể được sử dụng làm gen nhận diện đặc hiệu biến thể gen ngô *AAD-1* DAS-40278-9.

Ví dụ 4. Xác định đặc điểm hệ gen qua gen đánh dấu SSR nằm ở sườn bên của DAS-40278-9

Để xác định đặc điểm và mô tả hệ gen vị trí đoạn cài xen, trình tự gen đánh dấu được định vị gần với đoạn cài xen được xác định. Panen của gen đánh dấu SSR đa hình được sử dụng để xác định và lập bản đồ vị trí gen chuyển. Biến thể gen pDAS1740-278 nằm trên nhiễm sắc thể 2 ở khoảng 20cM giữa gen đánh dấu SSR UMC1265 và MMC0111 ở khoảng 20cM trên bản đồ liên kết 2008 DAS của ngô. Bảng 6 tổng kết các thông tin về đoạn mồi cho hai gen đánh dấu này được phát hiện ở trạng thái gần nhau với gen chuyển pDAS1740-278.

Bảng 6. Tên đoạn mồi, thuốc nhuộm đánh dấu, vị trí locut, trình tự đoạn mồi ngược và xuôi, và các lưu ý quan trọng đối với gen đánh dấu nằm ở sườn bên gắn liền với biến thể gen pDAS1740-278.

Tên đoạn mồi	Nhãn	Chr	~cM	Bin	Đoạn mồi xuôi	Đoạn mồi ngược	Lưu ý
Umc1265	NED	2	20	2,02	SEQ ID NO: 30: 5' -- GCCTAGTCGCCT ACCCTACCAAT TACCCTACCAAT -3'	SEQ ID NO: 31: 5' -- TGTGTTCTTGA TT GGGTGAGACA T - 3'	Gen đánh dấu nằm ở sườn bên trái
mmc0111	FAM	2	20	2,03	SEQ ID NO: 32: 5' -- TACTGGGG ATTAGAGCAGA AG - 3'	SEQ ID NO: 33: 5' -- AATCTATGT GTGAACAGCA GC - 3'	Gen đánh dấu nằm ở sườn bên phải

Ví dụ 4.1. Phân lập gADN

gADN được chiết từ các nhánh lá bằng cách sử dụng kit thử nghiệm cây DNEasy 96 (Qiagen, Valencia, California). Các cải biến được thực hiện theo quy trình để phù hợp cho kỹ thuật tự động hóa. gADN đã phân lập được định lượng bằng cách sử dụng thuốc nhuộm PicoGreen® của Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Nồng độ của gADN được pha loãng đến 5ng/ul cho tất cả các mẫu bằng cách sử dụng nước vô trùng đã được khử ion.

Ví dụ 4.2. Sàng lọc gADN với gen đánh dấu

gADN đã được pha loãng được tạo kiểu gen với tập hợp con của các gen đánh dấu lặp lại trình tự đơn giản (SSR). Gen đánh dấu SSR được tổng hợp bằng Applied Biosystems (Foster City, California) với các đoạn mỗi xuôi được đánh dấu bằng nhãn phát huỳnh quang 6-FAM, HEX/VIC, hoặc NED (lần lượt là xanh da trời, xanh lá cây và màu vàng). Các gen đánh dấu được chia thành các nhóm hoặc panen dựa vào thể phát huỳnh quang của chúng và kích cỡ sản phẩm khuếch đại để tạo điều kiện thuận lợi phân thành phần và phân tích sau PCR.

PCR được thực hiện trong đĩa thử nghiệm 384 giếng với mỗi phản ứng chứa 5ng ADN hệ gen, 1,25X dung dịch đệm PCR (Qiagen, Valencia, California), 0,20uM mỗi đoạn mỗi ngược và đoạn mỗi xuôi, 1,25mM MgCl₂, 0,015mM mỗi dNTP, và 0,3 đơn vị HotStart Taq ADN polymeaza (Qiagen, Valencia, California). Việc khuếch đại được thực hiện trong hệ PCR GeneAmp 9700 với modul 384 đầu kép (Applied Biosystems, Foster City, California). Chương trình khuếch đại là như sau: (1) hoạt hóa ban đầu Taq ở 95°C trong 12 phút; (2) 30 giây ở 94 °C; (3) 30 giây ở 55 °C; (4) 30 giây ở 72 °C; (5) lặp lại các bước 2-4 trong 40 vòng; và (6) 30 phút kéo dài cuối ở 72 °C. Sản phẩm PCR cho mỗi panen gen đánh dấu SSR được phân thành phần cùng với nhau bằng cách bổ sung 2ul mỗi sản phẩm PCR từ cùng cây vào nước vô trùng đã được khử ion để tổng thể tích là 60ul. Các sản phẩm PCR đã được phân thành phần, 0,5ul được dán vào các đĩa tải 384 giếng chứa 5ul dung dịch đệm tải chứa tỷ lệ 1:100 của GeneScan 500 cặp bazơ LIZ kích cỡ chuẩn và ABI HiDi Formamit (Applied Biosystems, Foster City, California). Tiếp theo, các mẫu được nạp lên máy phân tích ABI Prism 3730xl DNA (Applied Biosystems, Foster City, California) để điện di mao quản bằng cách sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất với tổng thời gian tiến hành là 36 phút. Dữ liệu gen đánh dấu được thu gom bằng phần mềm thu gom trình tự

tự động ABI Prism 3730xl Phiên bản 4,0 và được chiết qua Phần mềm GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) để xác định đặc điểm alen và đánh dấu kích cỡ đoạn.

Ví dụ 4.3 Kết quả đánh dấu SSR

Dữ liệu đoạn môi cho các gen đánh dấu nằm ở sườn bên được nhận diện ở khoảng cách gần nhất với gen chuyển được nêu trong Bảng 6. Hai gen đánh dấu kết hợp gần nhất, UMC1265 và MMC0111, được định vị cách khoảng 20cM với đoạn cài xen gen chuyển trên nhiễm sắc thể 2.

Ví dụ 5. Xác định đặc điểm Protein AAD-1 trong biến thể gen DAS-40278-9

Các đặc tính sinh hoá của protein tái tổ hợp AAD-1 có nguồn gốc từ biến thể gen ngô chuyển gen DAS-40278-9 được xác định đặc điểm. Điện di trên gel natri dodecyl sulfat polyacrylamit (SDS-PAGE, được nhuộm Coomassie xanh da trời và phương pháp phát hiện glycoprotein), thẩm tách western, thử nghiệm kiểm tra chẩn đoán miễn dịch, quá trình đẩy rời laze bằng cơ chất (matrix assisted laser desorption)/phép phân tích phổ khối thời gian bay ion hóa (ionization time-of-flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS) và phân tích sắp xếp trình tự protein bằng MS liên tiếp được sử dụng để xác định đặc điểm các đặc tính sinh hoá của protein.

Ví dụ 5.1. Thử nghiệm bằng chẩn đoán miễn dịch

Sự có mặt của protein aad-1 trong mô lá của DAS-40278-9 được xác nhận bằng cách sử dụng băng thử nghiệm chẩn đoán miễn dịch bán trên thị trường của American Bionostica. Các băng này có thể phân biệt giữa thực vật chuyển gen và cây không chuyển gen bằng cách thử nghiệm các phần chiết lá thô (dữ liệu không được thể hiện). Các phần chiết không chuyển gen (XHH13) không chứa lượng có thể phát hiện được của protein có tính phản ứng miễn dịch. Kết quả này cũng được xác nhận bằng phép phân tích thẩm tách western .

Để thử nghiệm về sự biểu hiện của protein AAD-1, phân tích băng chẩn đoán miễn dịch được thực hiện. Bốn nhánh lá được thu gom từ mỗi cây với XHH13 (cây đối chứng) và biến thể gen DAS-40278-9 bằng cách kẹp mô giữa các nắp sập của các ống ly tâm nhỏ 1,5ml đã được đánh dấu riêng biệt. Khi tiếp nhận trong phòng thí nghiệm, 0,5mL dung dịch đệm chiết AAD-1 (American Bionostica, Swedesboro, NJ) được bổ sung vào mỗi ống, và mô được làm đồng nhất bằng cách sử dụng chày dùng một lần sau khi lắc mẫu trong ~10

giây. Sau khi làm đồng nhất, băng thử nghiệm được đặt vào ống và để phát triển trong ~ 5 phút. Sự có mặt hoặc không có mặt của protein AAD-1 trong phần chiết của cây được xác nhận dựa vào hình thái học (hoặc không có hình thái học) của vạch thử nghiệm trên băng chẩn đoán miễn dịch. Khi sự biểu hiện của protein AAD-1 được xác nhận đối với gen chuyển, mô của thân ngô được thu hoạch và đông khô nhanh và được cất giữ ở khoảng -80°C cho đến khi sử dụng

Ví dụ 5.2. Tinh chế protein AAD-1 từ ngô

Protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô, được tinh chế miễn dịch (khối lượng phân tử: ~33kDa) hoặc các phần nước chiết thô từ mô của thân ngô được chuẩn bị. Tất cả các mô lá và mô thân của ngô được thu hoạch và được vận chuyển đến phòng thí nghiệm như sau: Lá được cắt từ cây bằng kéo và được đặt trong túi vải và được cất giữ ở khoảng -20°C để sử dụng trong tương lai. Cuống được cắt ngay phần trên mọc trên đất một cách riêng rẽ, được đặt trong túi vải và ngay lập tức được làm đông lạnh ở khoảng -80°C trong ~6 giờ. Tiếp theo, cuống được đặt trong máy đông khô trong 5 ngày để loại bỏ nước. Khi mô đã được làm khô hoàn toàn chúng được nghiền thành bột mịn với băng khô và được cất giữ ở khoảng -80°C cho đến khi sử dụng.

Protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô được chiết từ mô thân đông khô nhanh trong dung dịch đệm trên cơ sở phosphat (xem bảng 7 về thành phần dung dịch đệm) bằng cách cân ~30 gam mô đông khô nhanh vào máy trộn lạnh bằng thủy tinh dung tích 1000mL và bổ sung 500mL dung dịch đệm chiết. Mô được trộn mạnh trong 60 giây và các protein hòa tan được thu hoạch bằng cách ly tâm mẫu trong 20 phút ở tốc độ 30.000 vòng/phút. Các viên tròn được chiết lại như được mô tả, và dịch nổi trên bề mặt được kết hợp và được lọc qua màng lọc 0,45μ. Dịch nổi trên bề mặt đã được lọc được tải ở khoảng +4°C lên cột ái lực miễn dịch kháng-aad-1 được liên hợp với kháng thể đơn dòng được điều chế bởi Strategic Biosolution Inc. (MAb 473F1 85,1; Protein A được tinh chế; Lô số: 609,03C-2-4; 6,5mg/mL (tổng số ~35,2mg)) (Windham, ME); được liên hợp với Sepharosa 4B được hoạt hóa bởi CNBr (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Các protein không gắn kết được thu gom và cột được rửa đều bằng dung dịch đệm amoni bicarbonat 20mM đã được làm lạnh sơ bộ, độ pH 8,0. Các protein gắn kết được rửa giải bằng NaSCN 3,5M, (Sigma, St. Louis, MO), dung dịch đệm 50mM Tris (Sigma, St. Louis, MO) độ pH 8,0. Bảy phân đoạn 5mL được thu gom và phân đoạn đánh số từ 2 đến 7 được thẩm tách

qua đêm ở khoảng +4°C với dung dịch đệm 10mM Tris, độ pH 8,0. Các phân đoạn này được kiểm tra bằng SDS-PAGE và thẩm tách western và các mẫu còn lại được cất giữ ở khoảng +4°C cho đến khi được sử dụng cho phân tích tiếp theo.

Bảng 7

Các chất tham chiếu có bán trên thị trường được sử dụng trong nghiên cứu này được nêu trong bảng dưới đây:

Chất tham chiếu	Tên sản phẩm	Số lô	Thử nghiệm	Số tham chiếu
Chất ức chế trypsin đậu tương	Thành phần của kit nhuộm Glycoprotein GelCode	IA110577	Glycosyl hoá	Pierce Cat #: 1856274
Peroxidaza cây cải củ cay	Thành phần của kit nhuộm Glycoprotein GelCode	JG124509	Glycosyl hoá	Pierce Cat #: 1856273
Phân đoạn V albumin huyết thanh bò (BSA)	Bộ chuẩn thử nghiệm protein BSA được pha loãng sơ bộ	FH71884 A	Glycosyl hoá, SDS-PAGE và Thẩm tách western	Pierce Cat #: 23208
Gen đánh dấu khối lượng phân tử đã được nhuộm sơ bộ	Novex Sharp Prestained Protein Markers	469212 & 419493	Thẩm tách western	Invitrogen Cat #: LC5800, Gen đánh dấu khối lượng phân tử 260, 160, 110, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 và 3,5 kDa
Gen đánh dấu khối lượng phân tử	Invitrogen Mark12 Protein Marker Mix	39983 & 399895	SDS-PAGE	Invitrogen Cat #: LC5677, Gen đánh dấu khối lượng phân tử 200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31,0, 21,5, 14,4, 6,0, 3,5 và 2,5 kDa

Protein gắn kết với cột ái lực miễn dịch được kiểm tra bằng SDS-PAGE và các kết quả đã cho thấy rằng các phân đoạn đã được rửa giải chứa Protein AAD-1 ở khoảng khối lượng phân tử là 33kDa. Ngoài ra, thẩm tách western cũng được thực hiện và là dương tính với protein AAD-1. Protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô được phân lập từ ~30g nguyên liệu thân đồng khô nhanh.

Ví dụ 5.3. SDS-PAGE và thẩm tách western

Mô đông khô nhanh từ biến thể gen thân DAS-40278-9 và XHH13 (~100mg) được cân trong ống ly tâm nhỏ dung tích 2ml và được chiết bằng ~1mL PBST (Sigma, St. Louis, MO) chứa 10% hỗn hợp chất ức chế proteaza cây (Sigma, St. Louis, MO). Việc chiết được tạo điều kiện thuận lợi bằng cách bổ sung 4 giọt thể quả nhỏ và nghiền Geno mẫu trong 1 phút. Sau khi nghiền, các mẫu được ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 20000 vòng/phút và dịch nổi trên bề mặt được trộn theo tỷ lệ 4:1 với 5x dung dịch đệm mẫu Laemmli (2% SDS, 50mM Tris độ pH 6,8, 0,2mg/mL bromphenol xanh da trời, 50% (khối lượng/khối lượng) glyxerol chứa 10% 2-mercaptoetanol được bổ sung sạch) và được đun nóng trong 5 phút ở ~100°C. Sau khi ly tâm sơ bộ, 45uL dịch nổi trên bề mặt được tải trực tiếp lên gel SDS-PAGE theo chuẩn BioRad (Bio-Rad, Hercules, CA) thích hợp trong modul gel tế bào chuẩn. Chuẩn tham chiếu dương tính của AAD-1 có nguồn gốc vi khuẩn được tái tạo huyền phù ở 1mg/mL trong PBST độ pH 7,4 và được pha loãng tiếp bằng PBST. Tiếp theo, mẫu được trộn với dung dịch đệm Bio-Rad Laemmli với 5% 2-mercaptoetanol và được xử lý như được mô tả trước đây. Điện di được tiến hành với dung dịch đệm Tris/glyxin/SDS (Bio-Rad, Hercules, CA) ở điện áp 150 - 200V cho đến khi thuốc nhuộm ở phía trước tiếp xúc đến phần cuối của gel. Sau khi tách, gel được cắt đôi và một nửa được nhuộm thuốc nhuộm protein Pierce GelCode Xanh da trời và một nửa còn lại được điện thẩm tách với màng nitroxenluloza (Bio-Rad, Hercules, CA) với tế bào truyền quang điện thẩm chuyển Mini (Bio-Rad, Hercules, CA) trong 60 phút trong điều kiện điện áp không đổi là 100 vôn. Dung dịch đệm chuyển chứa 20% metanol và dung dịch đệm Tris/glyxin từ Bio-Rad. Để phát hiện miễn dịch, màng được phát hiện bằng kháng thể thổ đa clon đặc hiệu AAD-1 (Strategic Biosolution Inc., Newark, DE, Protein A kháng thể thổ đa clon được tinh chế Lot #: DAS F1 197-15 1, 1,6mg/mL). Thể liên hợp của IgG kháng thổ của dê (H+L) và dung dịch kiểm phosphataza (Pierce Chemical, Rockford, IL) được sử dụng làm kháng thể thứ cấp. Cơ chất SigmaFast BCIP/NBT được sử dụng để phát triển và hiển thị các dải protein có tính phản ứng miễn dịch. Màng được rửa đều với nước để dừng phản ứng và các kết quả được lưu lại với máy quét số (Hewlett Packard, Palo Alto, CA)

Ở AAD-1 được tạo ra từ *P. fluorescens*, phần lớn dải protein, như được hiển thị trên gel SDS-PAGE được nhuộm Coomassie, là khoảng 33kDa. Như mong muốn, protein

AAD-1 có nguồn gốc từ ngô tương ứng (biến thể gen DAS-40278-9) biến thể gen về kích cỡ với các protein biểu hiện vi khuẩn. Dự đoán rằng các phân đoạn được tinh chế của cây chứa lượng nhỏ các tạp chất không có tính phản ứng miễn dịch ngoài protein AAD-1. Các protein được cùng tinh chế dường như được giữ lại trên cột nhờ tương tác yếu với ma trận cột hoặc rò rỉ kháng thể đơn dòng ra khỏi cột trong điều kiện rửa giải nghiêm ngặt. Các nhà nghiên cứu khác cũng đã có báo cáo về sự hấp phụ không đặc hiệu của peptit và axit amin lên chất ngoại hấp miễn dịch Sepharosa 4B được hoạt hóa xyanogen-bromua (Kennedy và Barnes, 1983; Holroyde và các đồng tác giả, 1976; Podlaski và Stern, 2008).

Protein AAD-1 có nguồn gốc *Pseudomonas* cho thấy tín hiệu dương tính của kích cỡ mong muốn nhờ phép phân tích thẩm tách western kháng thể đa khuẩn lạc. Điều này cũng quan sát được ở phần chiết thân ngô chuyển gen DAS-40278-9. Trong phép phân tích thẩm tách western AAD-1, không quan sát được các protein có tính phản ứng miễn dịch ở phần chiết đối chứng XHH13 và cũng không thấy các protein có kích cỡ thay thế (các kết tập hoặc sản phẩm suy biến) trong các mẫu chuyển gen.

Ví dụ 5.4. Phát hiện quá trình glycosyl hoá sau phiên mã

Protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô được tinh chế bằng sắc ký ái lực miễn dịch, (Phân đoạn số 3) được trộn theo tỷ lệ 4:1 với 5x dung dịch đệm Laemmli. AAD-1 có nguồn gốc vi khuẩn, chất ức chế trypsin đậu tương, albumin huyết thanh bò và peroxidaza cây cải ốc ven biển được pha loãng bằng nước Milli-Q đến nồng độ xấp xỉ của AAD-1 có nguồn gốc cây và được trộn với dung dịch đệm Bio-Rad. Các protein tiếp theo được đun nóng ở ~95°C trong 5 phút và được ly tâm ở tốc độ 20000 vòng/phút trong 2 phút để thu được dịch nổi trên bề mặt đã được gạn. Dịch nổi trên bề mặt thu được được đưa trực tiếp lên gel theo chuẩn Bio-Rad và được điện di với dung dịch đệm chạy XT MES (Bio-Rad, Hercules, CA) về cơ bản như được mô tả trên đây chỉ khác là điện di được chạy ở 170V trong ~60 phút. Sau khi điện di, gel được cắt đôi và một nửa được nhuộm thuốc nhuộm GelCode xanh da trời cho protein tổng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi quá trình nhuộm hoàn thành, gel được quét với tỷ trọng kế Molecular Dynamics để thu được bản ghi hình ảnh vĩnh cửu của gel. Một nửa gel còn lại được nhuộm bằng kit nhuộm Glycoprotein GelCode (Pierce Chemical, Rockford, IL) theo hướng dẫn của nhà sản xuất để hiển thị glycoprotein. Glycoprotein (với giới hạn phát hiện là 0,625ng cho mỗi dải) được hiển thị ở dạng các dải đỏ tươi trên nền màu hồng nhạt. Sau khi nhuộm glycoprotein hoàn

thành, gel được quét bằng máy quét số Hewlett Packard để thu được bản ghi hình ảnh vĩnh cửu của gel. Sau khi giữ hình ảnh nhuộm glycosyl hóa, gel được nhuộm GelCode xanh da trời để xác định sự có mặt của các protein không được glycosyl hóa. Các kết quả đã cho thấy rằng cả protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô và vi khuẩn đều không có các hydrat cacbon được liên kết cộng hóa trị có thể phát hiện được. Kết quả này cũng được xác nhận bằng dấu lăn ngón tay khối peptit.

Ví dụ 5.5. Phép phân tích phổ khối dấu lăn ngón tay khối peptit và sắp xếp trình tự AAD-1 có nguồn gốc từ ngô và *Pseudomonas*

Phân tích phổ khối về AAD-1 có nguồn gốc từ *Pseudomonas* và ngô được tiến hành. Protein AAD-1 có nguồn gốc từ thân ngô chuyển gen (biến thể gen DAS-40278-9) được đưa vào phân cắt trong dung dịch bằng trypsin tiếp đó là MALDI-TOF MS và ESI-LC/MS. Lượng peptit đã được phát hiện so với lượng peptit suy ra dựa vào các vị trí phân cắt proteaza có khả năng trong trình tự của protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô. Phân cắt lý thuyết được tạo ra trong *silico* bằng cách sử dụng Phần mềm miễn phí Worksheet phân tích protein (Protein Analysis Worksheet - PAWS) từ Proteometrics LLC. Protein AAD-1, khi đã được biến tính, được phân cắt một cách dễ dàng nhờ proteaza và sẽ tạo ra vô số đỉnh peptit.

Trong phân cắt bằng trypsin protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô chuyển gen (biến thể gen DAS-40278-9), các đoạn peptit đã được phát hiện phủ gần như toàn bộ protein trình tự chỉ thiếu một đoạn trypsin nhỏ ở đầu tận cacbon của protein, từ F²⁴⁸ đến R²⁵³ và một đoạn peptit ngắn (2 axit amin). Phân tích này đã xác nhận trình tự axit amin protein có nguồn gốc từ ngô khớp với trình tự axit amin protein AAD-1 có nguồn gốc từ vi khuẩn. Kết quả của các phân tích này cho thấy rằng trình tự axit amin của protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô là tương đương với protein biểu hiện *P. fluorescens*.

Ví dụ 5.5.1. Sắp xếp trình tự đoạn peptit trypsin

Ngoài dấu lăn ngón tay khối peptit, các gốc axit amin ở các đầu tận cùng nitơ và cacbon của protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô (ái lực miễn dịch được tinh chế từ biến thể gen ngô DAS-40278-9) được sắp xếp trình tự và so với trình tự của protein có nguồn gốc từ vi khuẩn. Trình tự protein thu được, bằng phép phân tích phổ khối liên tiếp, cho 11 gốc thứ nhất của các protein có nguồn gốc từ vi khuẩn và ngô (bảng 8). Trình tự axit amin

cho cả hai dạng protein này là A' H A A L S P L S Q R" (SEQ ID NO:30) cho thấy metionin đầu tận cùng nitơ đã được loại bỏ nhờ aminopeptidaza (bảng 8). Trình tự protein AAD-1 đầu tận cùng nitơ được mong muốn là M' A H A A L S P L S Q R² (SEQ ID NO:31). Các kết quả này đưa ra giả thuyết rằng trong khi hoặc sau khi dịch mã ở ngô và *P. fluorescens*, metionin đầu tận cùng nitơ bị phân cắt bởi metionin aminopeptidaza (MAP). Các MAP phân cắt các gốc methionyl nhanh khi gốc thứ hai trên protein nhỏ như Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Pro, và Val (Walsh, 2006). Ngoài metionin được loại bỏ, phần nhỏ của peptit đầu tận cùng nitơ của protein AAD-1 thể hiện đã được axetyl hóa sau khi metionin đầu tận cùng nitơ bị phân cắt (bảng 8). Kết quả này gặp thường xuyên với protein biểu hiện sinh vật có nhân điển hình (cây) vì khoảng 80-90% gốc đầu tận cùng nitơ được cải biến (Polevoda và Sherman, 2003). Ngoài ra, đã thấy rằng các protein với serin và alanin ở các đầu tận cùng nitơ được axetyl hóa thường xuyên nhất (Polevoda và Sherman, 2002). Hai quá trình cùng dịch mã, phân cắt gốc metionin đầu tận cùng nitơ và axetyl hóa đầu tận cùng nitơ, là các cải biến phổ biến nhất và xảy ra ở phần lớn (~85%) các protein sinh vật có nhân điển hình (Polevoda và Sherman, 2002). Tuy nhiên, các ví dụ chứng minh mức tin cậy sinh học đi liền với quá trình axetyl hóa đầu tận cùng nitơ là hiếm (Polevoda và Sherman, 2000).

Bảng 8. Tóm tắt về dữ liệu trình tự đầu tận cùng nitơ của các protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô và vi khuẩn

Nguồn	Trình tự đầu tận cùng nitơ mong muốn ¹	
<i>P. fluorescens</i>	M ¹ A H A A L S P L S Q R ¹² (SEQ ID NO:31)	
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	M ¹ A H A A L S P L S Q R ¹²	
Nguồn	Tương đối ³	Trình tự đầu tận cùng nitơ phát hiện được ² Độ phong
phú		
<i>P. fluorescens</i>	A H A A L S P L S Q R ¹²	100%
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	A H A A L S P L S Q R ¹²	31%
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	N-Ac A H A A L S P L S Q R ¹²	3%
		(SEQ ID NO:30)
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	H A A L S P L S Q R ¹²	50%
		(SEQ ID NO:32)
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	A A L S P L S Q R ¹²	6%
		(SEQ ID NO:33)
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	A L S P L S Q R ¹²	12%
		(SEQ ID NO:34)

¹Trình tự đầu tận cùng nitơ mong muốn của 12 gốc axit amin thứ nhất của AAD-1 có nguồn gốc từ *P. fluorescens* và ngô.

²Trình tự đầu tận cùng nitơ phát hiện được của AAD-1 có nguồn gốc từ *P. fluorescens* và ngô.

³Dữ liệu phân tích phổ khối liên tiếp đối với peptit đầu tận cùng nitơ đã cho thấy hỗn hợp chứa AHAALSPLSQR (được axetyl hóa) và *N*-Axetyl-AHAALSPLSQR (được axetyl hóa).

“Các đầu tận cùng nitơ đã tách rời” cũng được phát hiện (các peptit tương ứng với trình tự axit amin HAALSPLSQR, AALSPLSQR, và ALSPLSQR). Độ phong phú tương đối, ước lượng số lượng đoạn peptit tương đối, được thực hiện dựa vào các vùng pic LC tương ứng được đo ở 214nm.

Lưu ý:

Các chỉ số trên (R^x) chỉ ra số gốc axit amin trong trình tự.

Các từ viết tắt của gốc axit amin:

A:	alanin	H:	histidin
L:	loxin	M:	metionin
P:	prolin	Q:	glutamin
R:	arginin	S:	serin
T:	threonin		

Ngoài *N*-axetyl hóa, cũng có quá trình cắt đứt đầu tận cùng nitơ nhẹ xuất hiện trong quá trình tinh chế protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô (bảng 8). “Các đầu đã bị rách” này dẫn đến việc mất các axit amin A², H³ và A⁴ (ở dạng khác nhau và số lượng khác nhau) có nguồn gốc từ protein ngô. Đã nghĩ rằng quá trình cắt đứt này phải xảy ra trong quá trình tinh chế protein AAD-1 như đầu phát hiện phương pháp thẩm Tây của các phân chiết lá thô chứa một dải quần ở cùng MW như protein AAD-1 có nguồn gốc từ vi khuẩn. Dung dịch đệm chiết cho các mẫu được thẩm tách western chứa lượng dư hỗn hợp chất ức chế proteaza chứa hỗn hợp của chất ức chế proteaza với tính đặc hiệu rộng để ức chế serin, cystein, aspartic, và proteaza kim loại, và aminopeptidaza.

Trình tự đầu tận cùng cacbon của các protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô và vi khuẩn được xác định như được mô tả trên đây và so với trình tự axit amin mong muốn (bảng 9). Các kết quả đã chỉ ra trình tự đã được đo là biến thể gen với trình tự mong muốn, và cả protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô và vi khuẩn đều biến thể gen nhau và không bị sửa đổi ở đầu tận cùng cacbon.

Bảng 9. Tóm tắt về dữ liệu trình tự đầu tận cacbon của các protein AAD-1 có nguồn gốc từ ngô và vi khuẩn

Nguồn	Trình tự đầu tận cacbon mong muốn ¹	
<i>P. fluorescens</i>	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶	
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶	(SEQ ID NO:35)
Nguồn	Trình tự đầu tận cacbon đã được phát hiện ²	
<i>P. fluorescens</i>	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶	
Biến thể gen DAS-40278-9 ngô	²⁸⁷ T T V G G V R P A R ²⁹⁶	(SEQ ID NO:35)

¹Trình tự đầu tận cacbon mong muốn của 10 gốc các axit amin cuối của AAD-1 có nguồn gốc từ *P. fluorescens* và ngô.

²Trình tự đầu tận cacbon đã được phát hiện của AAD-1 có nguồn gốc từ *P. fluorescens* và ngô.

Lưu ý:

Các chỉ số trên (R^x) cho biết số gốc axit amin trong trình tự.

Các từ viết tắt của gốc axit amin:

A:	alanin	G:	glyxin
P:	prolin	R:	arginin
T:	threonin	V:	valin

Ví dụ 6. Biểu hiện cánh đồng, phân tích thành phần dinh dưỡng và các đặc tính nông học của dòng ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9

Mục đích của nghiên cứu này là để xác định mức protein AAD-1 được tìm thấy trong mô của ngô. Ngoài ra, phân tích thành phần được thực hiện trên vỏ bắp và hạt ngô để nghiên cứu sự tương đương giữa dòng ngô đẳng gen không biến nạp và dòng ngô chuyển gen DAS-40278-9 (không được phun, được phun với 2,4-D, được phun với quizalofop, và được phun với 2,4-D và quizalofop). Các đặc tính nông học của dòng ngô đẳng gen không biến nạp cũng so với ngô AS-40278-9. Các thử nghiệm biểu hiện cánh đồng, thành phần, và nông học được tiến hành ở sáu vị trí định vị trong chủ yếu các khu vực trồng ngô của Mỹ và Canada. Các vị trí này là các vùng có thực tiễn nông nghiệp và các điều kiện môi trường đa dạng. Các thử nghiệm này được định vị ở Iowa, Illinois (2 vị trí), Indiana, Nebraska và Ontario, Canada.

Tất cả cá giá trị trung bình vị trí cho mẫu đối chứng, các mẫu AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + cả các mẫu nhập không được phun nằm trong khoảng lý thuyết đối với ngô. Quan sát được số sai khác có ý nghĩa giới hạn giữa các mẫu

AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D hoặc AAD-1 + cả ngô và mẫu đối chứng không được phun, nhưng các sai khác này không được xem là có nghĩa sinh học vì chúng nhỏ và các kết quả nằm trong khoảng đã được tìm thấy ở ngô thương phẩm. Sơ đồ về các kết quả về thành phần không chỉ ra sự sai khác về thành phần liên quan đến việc xử lý có nghĩa sinh học bất kỳ trong số các mẫu AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D hoặc AAD-1 + cả ngô và dòng ngô đối chứng không được phun. Kết luận, không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + cả các kết quả thành phần ngô xác nhận sự tương đương của AAD-1 (Biến thể gen DAS 40278-9) ngô với các dòng ngô thông thường.

Ví dụ 6.1. Các dòng ngô được thử nghiệm

Hạt lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và cây đối chứng là hạt lai thông thường của cùng nền gen làm dòng chất thử nghiệm, nhưng không chứa biến thể gen DAS-40278-9, được nêu trong bảng 10.

Bảng 10.

Thử nghiệm số	Mô tả
1	Mẫu đối chứng không AAD-1
2	AAD-1 không được phun
3	AAD-1 được phun w/ quizalofop
4	AAD-1 được phun w/ 2,4-D
5	AAD-1 được phun w/ 2,4-D và quizalofop

Cây ngô được mô tả trên đây được sinh trưởng ở các vị trí trong chủ yếu các vùng sinh trưởng ngô của Mỹ và Canada. Sáu nhà máy thử nghiệm cánh đồng, Richland, IA; Carlyle, IL; Wyoming, IL; Rockville, IN; York, NE; và Branchton, Ontario, Canada (được gọi là IA, IL1, IL2, IN, NE và ON) là các vùng có thực tiễn nông nghiệp và các điều kiện môi trường đa dạng đối với ngô.

Hạt ngô thử nghiệm và đối chứng được trồng ở tỷ lệ gieo hạt là khoảng 24 hạt cho mỗi luống với khoảng cách hạt trong mỗi luống là khoảng 10 in (25cm). Ở mỗi vị trí, 4 sơ đồ biến thể gen nhau của mỗi lần xử lý được thiết lập, với mỗi sơ đồ chứa các luống 2-25 ft. Các sơ đồ được sắp xếp theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên (randomized complete block - RCB), với ngẫu nhiên duy nhất ở mỗi vị trí. Mỗi sơ đồ ngô được tạo biên bởi 2 luống ngô lai không chuyển gen có tính thuần thực tương tự. Toàn bộ vị trí thử nghiệm

được bao quanh bởi tối thiểu 12 luống (hoặc 30 ft) ngô lai không chuyển gen có tính thuần thực tương đối.

Ứng dụng thực tế phòng trừ côn trùng, cỏ dại, và bệnh thích hợp được áp dụng để tạo ra cây trồng có thể chấp nhận được trong nông nghiệp. Nhiệt độ tối thiểu và nhiệt độ tối đa hàng tháng cùng với lượng mưa và việc tưới là trung bình cho vị trí. Các khoảng giá trị này gặp thông thường trong sản xuất ngô.

Ví dụ 6.2. Ứng dụng thuốc diệt cỏ

Xử lý bằng thuốc diệt cỏ được áp dụng với thể tích phun khoảng 20 gallon cho mỗi mẫu Anh (187L/ha). Các ứng dụng này được thiết kế để tạo ra bản sao thực tiễn thương mại.

Bảng 11 nêu các thuốc diệt cỏ được sử dụng.

Thuốc diệt cỏ	TSN	Nồng độ
Weedar 64	026491-0006	39%, 3,76 lb ae ^a /gal, 451 g ae/l
Assure II	106155	10,2%, 0,87 lb ai ^b /gal, 104 g ai/l

^aae = đương lượng axit.

^bai = hoạt chất.

2,4-D (Weedar 64) được dùng làm 3 ứng dụng gieo quá mức (over-the-top) đối với các thử nghiệm 4 và 5 (tổng theo mùa là 3lb ae/A). Các ứng dụng riêng lẻ là ở giai đoạn trước nảy mầm và giai đoạn khoảng V4 và V8 – V8,5. Các tỷ lệ dùng đích riêng lẻ là 1,0lb ae/A đối với Weedar 64, hoặc 1120g ae/ha. Tỷ lệ dùng thực tế nằm trong khoảng từ 1096 – 1231g ae/A.

Quizalofop (Assure II) được dùng làm ứng dụng gieo over-the-top đối với các thử nghiệm 3 và 5. Đặt thời gian ứng dụng là ở khoảng giai đoạn sinh trưởng V6. Tỷ lệ dùng đích là 0,0825lb ai/A đối với Assure II, hoặc 92g ai/ha. Tỷ lệ dùng thực tế nằm trong khoảng từ 90,8 – 103g ai/ha.

Ví dụ 6.3. Thu gom dữ liệu nông học và kết quả

Các đặc tính nông học được ghi lại cho tất cả các thử nghiệm trong các khối 2, 3, và 4 ở mỗi vị trí. Bảng 2 liệt kê các đặc tính đo được sau.

Bảng 12.

Tính trạng	Đặt thời gian đánh giá	Mô tả dữ liệu
Quần thể sớm	V1 và V4	Số cây nảy mầm trong mỗi sơ đồ.
Sức sống của cây biến thể gen con	V4	Ước lượng bằng thị giác về sức sống trung bình của các cây đã nảy mầm trong mỗi sơ đồ
Sức sống/hư hại của cây	Khoảng 1-2 tuần sau khi dùng	Cây hư hại do dùng thuốc diệt cỏ.
Thời gian đến khi tạo tơ	Khoảng 50% tạo tơ	Số lượng đơn vị nhiệt đã được tích lũy từ thời gian gieo trồng cho đến khi 50% cây được nảy mầm.
Thời gian để phần hoa rụng	Khoảng 50% phần hoa rụng	Số lượng đơn vị nhiệt đã được tích lũy từ thời gian gieo trồng cho đến khi 50% cây rụng phần hoa
Khả năng sống của phần hoa	Khoảng 50% phần hoa rụng	Đánh giá màu sắc phần hoa và hình dạng theo thời gian
Chiều cao của cây	Khoảng R6	Chiều cao đến đỉnh của cụm hoa hình đuôi sóc
Chiều cao tai	Khoảng R6	Chiều cao từ nền đến tai đầu tiên
Vị trí tạm thời của cuống	Khoảng R6	ước tính bằng thị giác về tỷ lệ phần trăm của cây trong sơ đồ với cuống bị gãy dưới tai đầu tiên
Vị trí tạm thời của rễ	Khoảng R6	ước tính bằng thị giác về tỷ lệ phần trăm của cây trong sơ đồ nghiêng khoảng 30° hoặc nhiều hơn ở ~1/2 mét đầu tiên trên bề mặt đất
Quần thể cuối	Khoảng R6	Số lượng còn lại trên mỗi sơ đồ
Ngày đến thuần thực	Khoảng R6	Số lượng đơn vị nhiệt đã được tích lũy từ thời gian gieo trồng cho đến khi 50% cây đạt thuần thực về mặt sinh lý học.
Biểu hiện màu xanh	Khoảng R6	Sức khỏe toàn diện của cây
Tỷ lệ mắc phải bệnh	Khoảng R6	ước tính bằng thị giác về tỷ lệ mắc phải bệnh của lá
Mức hư hại do côn trùng	Khoảng R6	ước tính bằng thị giác về mức hư hại

Lưu ý: đơn vị nhiệt = ((Nhiệt độ tối đa + Nhiệt độ tối thiểu) / 2) – 50°F

Phân tích về dữ liệu nông nghiệp được thu gom từ mẫu ngô đối chứng, AAD-1 không được phun, AAD-1 + 2,4-D, AAD-1 + quizalofop, và AAD-1 + được phun cả hai được tiến hành. Đối với phân tích vị trí chéo, không quan sát được sự sai khác có ý nghĩa thống kê đối với quần thể sớm (V1 và V4), sức sống, quần thể cuối, mức hư hại của cây trồng, thời gian đến khi tạo tơ, thời gian để phấn hoa rụng, vị trí tạm thời của cuống, vị trí tạm thời của rễ, tỷ lệ mắc phải bệnh, mức hư hại do côn trùng, ngày đến thuần thực, chiều cao của cây, và khả năng sống của phấn hoa (hình dạng và màu sắc) các giá trị trong phân tích tóm tắt định vị chéo (Bảng 13). Đối với biểu hiện màu xanh và chiều cao tai, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa giữa thử nghiệm đối chứng và AAD-1 + quizalofop, nhưng không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc False Discovery Rates (FDR) được điều chỉnh các giá trị P (bảng 13).

Bảng 13. Phân tích tóm tắt về kết quả đặc tính nông học các vị trí chéo đối với DAS-40278-9 AAD-1 của ngô (được phun và không được phun) và mẫu đối chứng

Đặc điểm phân tích	Hiệu quả xử lý toàn bộ (Pr>F) ^a	Đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^c	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Quần thể sớm V1 (số cây)	(0,351)	42,8	41,3 (0,303, 0,819)	41,7 (0,443, 0,819)	41,9 (0,556, 0,819)	44,1 (0,393, 0,819)
Quần thể sớm V4 (số cây)	(0,768)	43,1	43,3 (0,883, 0,984)	43,7 (0,687, 0,863)	44,3 (0,423, 0,819)	44,8 (0,263, 0,819)
Sức sống của cây biến thể gen con ^d	(0,308)	7,69	7,39 (0,197, 0,819)	7,36 (0,161, 0,819)	7,58 (0,633, 0,819)	7,78 (0,729, 0,889)
Quần thể cuối (số cây)	(0,873)	40,1	39,6 (0,747, 0,889)	39,7 (0,802, 0,924)	39,9 (0,943, 1,00)	41,1 (0,521, 0,819)
Mức hư hại của cây trồng – dùng lần thứ 1 ^e	NA ¹	0	0	0	0	0
Mức hư hại của cây trồng – dùng lần thứ 2 ^e	(0,431)	0	0 (1,00, 1,00)	0 (1,00, 1,00)	0 (1,00, 1,00)	0,28 (0,130, 0,819)

Mức hư hại của cây trồng – dùng lần thứ 3 ^e	NA	0	0	0	0	0
Mức hư hại của cây trồng – dùng lần thứ 4 ^e	NA	0	0	0	0	0
Thời gian đến khi tạo tơ (đơn vị nhiệt) ^f	(0,294)	1291	1291 (0,996, 1,00)	1293 (0,781, 0,917)	1304 (0,088, 0,819)	1300 (0,224, 0,819)
Thời gian để phần hoa rụng (đơn vị nhiệt) ^f	(0,331)	1336	1331 (0,564, 0,819)	1342 (0,480, 0,819)	1347 (0,245, 0,819)	1347 (0,245, 0,819)
Hình dạng phần hoa 0 phút (%) ^g	(0,872)	10,9	10,9 (0,931, 1,00)	11,3 (0,546, 0,819)	11,4 (0,439, 0,819)	11,3 (0,605, 0,819)
Hình dạng phần hoa 30 phút (%)	(0,486)	49,2	50,8 (0,618, 0,819)	46,4 (0,409, 0,819)	48,1 (0,739, 0,889)	51,9 (0,409, 0,819)
Hình dạng phần hoa 60 phút (%)	(0,724)	74,4	74,7 (0,809, 0,924)	73,6 (0,470, 0,819)	73,9 (0,629, 0,819)	75,0 (0,629, 0,819)
Hình dạng phần hoa 120 phút (%)	(0,816)	82,6	82,6 (1,00, 1,00)	82,6 (1,00, 1,00)	82,6 (1,00, 1,00)	82,5 (0,337, 0,819)
Đặc điểm phân tích	Hiệu quả xử lý toàn bộ (Pr>F) ^a	Đối chứng	Không được phun (giá trị P, ^b Giá trị P được điều chỉnh) ^c	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Màu sắc phần hoa 30 phút (%)	(0,524)	51,9	52,5 (0,850, 0,960)	48,9 (0,306, 0,819)	50,3 (0,573, 0,819)	53,6 (0,573, 0,819)
Màu sắc phần hoa 60 phút (%)	(0,332)	75,3	75,9 (0,612, 0,819)	74,2 (0,315, 0,819)	74,2 (0,315, 0,819)	75,9 (0,612, 0,819)
Màu sắc phần hoa 120 phút (%)	NA	84,0	84,0	84,0	84,0	84,0
Vị trí tạm thời của cuống (%)	(0,261)	5,11	5,22 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)	5,00 (0,356, 0,819)
Vị trí tạm thời của rễ (%)	(0,431)	0,44	0,17 (0,457, 0,819)	0,72 (0,457, 0,819)	0,17 (0,457, 0,819)	0,11 (0,373, 0,819)

Biểu hiện màu xanh ⁱ	(0,260)	4,67	4,28 (0,250, 0,819)	3,92 (0,034 ^m , 0,819)	4,17 (0,144, 0,819)	4,11 (0,106, 0,819)
Tỷ lệ mắc phải bệnh ^j	(0,741)	6,42	6,22 (0,383, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)	6,17 (0,265, 0,819)
Mức hư hại do côn trùng ^k	(0,627)	7,67	7,78 (0,500, 0,819)	7,78 (0,500, 0,819)	7,72 (0,736, 0,889)	7,56 (0,500, 0,819)
Ngày đến thuần thực (đơn vị nhiệt) ^f	(0,487)	2411	2413 (0,558, 0,819)	2415 (0,302, 0,819)	2416 (0,185, 0,819)	2417 (0,104, 0,819)
Chiều cao của cây (cm)	(0,676)	294	290 (0,206, 0,819)	290 (0,209, 0,819)	291 (0,350, 0,819)	291 (0,286, 0,819)
Đặc điểm phân tích	Hiệu quả xử lý toàn bộ (Pr>F) ^a	đối chứng	Không được phun (giá trị P, ^b Giá trị P được điều chỉnh) ^c	được phun Quizalofop (giá trị P, ^b Giá trị P được điều chỉnh)	được phun 2,4-D (giá trị P, ^b Giá trị P được điều chỉnh)	được phun cả hai (giá trị P, ^b Giá trị P được điều chỉnh)
Chiều cao tai (cm)	(0,089)	124	120 (0,089, 0,819)	118 (0,018 ^m , 0,786)	121 (0,214, 0,819)	118 (0,016 ^m , 0,786)

^a Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^b So sánh về các xử lý được phun và không được phun với đối chứng bằng cách sử dụng thử nghiệm t.

^c Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^d ước tính bằng thị giác trên thang đo 1-9; 9 = toàn bộ cây với lá lớn khỏe mạnh.

^e thang đo 0-100%; với 0 = không hư hại và 100 = cây bị chết.

^f Số lượng đơn vị nhiệt đã được tích lũy từ thời gian gieo trồng.

^g thang đo 0-100%; với % hạt phấn hoa có thành méo mó.

^h thang đo 0-100%; với % hạt phấn hoa có màu vàng đậm.

ⁱ ước tính bằng thị giác trên thang đo 1-9 với 1 không nhìn thấy mô màu xanh lá cây.

^j ước tính bằng thị giác trên thang đo 1-9 với 1 có tính chống chịu bệnh kém.

^k ước tính bằng thị giác trên thang đo 1-9 với 1 có tính chống chịu côn trùng kém.

^l NA = Phân tích thống kê không được thực hiện do không có biến dị qua các bản sao hoặc xử lý.

^m Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

Ví dụ 6.4. Thu gom mẫu

Các mẫu để biểu hiện và phân tích thành phần được thu gom như được liệt kê trong bảng 14.

Bảng 14.

		Các mẫu cho mỗi thử nghiệm			
Khối	Mô	Giai đoạn sinh trưởng ^a	Mẫu Kích cỡ	Thử nghiệm đối chứng 1	Các thử nghiệm 2-5
1 (biểu hiện)	Lá	V2-4	3 lá	3	3
	Lá	V9	3 lá	3	3
	Phấn hoa ^b	R1	1 cây	3	3
	Rễ ^b	R1	1 cây	3	3
	Lá ^b	R1	1 lá	3	3
	Vỏ bắp	R4	2 cây ^c	3	3
	Cây nguyên vẹn	R6	2 cây ^c	3	3
	Hạt	R6-Tính thuần th 1 tai		3	3
Khối	Mô	Giai đoạn sinh trưởng ^a	Mẫu Kích cỡ	Thử nghiệm đối chứng 1	Các thử nghiệm 2-5
2 – 4 (thành phần)	Vỏ bắp	R4	3 cây ^c	1	1
	Hạt	R6-Tính thuần th 5 tai		1	1
^a Khoảng giai đoạn sinh trưởng. ^b Các mẫu phấn hoa, rễ, và lá được thu gom ở R1 được thu gom từ cùng cây. ^c Hai cây được chặt, gộp lại và lấy mẫu con đối với biểu hiện, hoặc 3 cây đối với thành phần.					

Ví dụ 6.5. Xác định protein AAD-1 trong các mẫu ngô

Các mẫu ngô được phân tích về lượng protein AAD-1. Protein AAD-1 hòa tan có thể chiết được được xác định bằng cách sử dụng kit thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym (ELISA) được mua của Beacon Analytical System, Inc. (Portland, ME).

Các mẫu mô ngô được tách ra từ các cây thử nghiệm và được điều chế cho phân tích biểu hiện bằng cách nghiền thô, dung môi hóa và nghiền mịn (nếu cần) bằng Geno/Grinder (Certiprep, Metuchen, New Jersey). Không đòi hỏi bước điều chế bổ sung đối với phần hoa. Protein AAD-1 được chiết từ mô ngô với dung dịch nước muối được tạo đệm phosphat chứa chất tẩy rửa Tween-20 (PBST) chứa 0,5% albumin huyết thanh bò (BSA). Đối với phần hoa, protein được chiết bằng 0,5% PBST/BSA đệm chứa 1mg/mL natri ascorbat và 2% hỗn hợp chất ức chế proteaza. Mô cây và các phần chiết phần hoa được ly tâm; dung dịch nổi trên bề mặt được thu gom, được pha loãng bằng dung dịch đệm thích hợp nếu cần, và được phân tích bằng cách sử dụng kit ELISA AAD-1 ở dạng bánh kẹp (sandwich). Kit này sử dụng các bước sau. Một lượng nhỏ mẫu đã được pha loãng và kháng thể đơn dòng kháng AAD-1 đã được biotinyl hóa được ủ trong các lỗ của đĩa vi chuẩn độ được phủ bằng kháng thể đơn dòng kháng AAD-1 đã được cố định. Các kháng thể này gắn kết với protein AAD-1 trong các lỗ và tạo thành "dạng bánh kẹp" (sandwich) với protein AAD-1 được gắn kết giữa kháng thể hòa tan và kháng thể cố định. Các mẫu không được gắn kết và thể liên hợp tiếp theo được loại ra khỏi đĩa bằng cách rửa với PBST. Một lượng dư thể liên hợp streptavidin-enzym (dung dịch kiềm phosphatase) được bổ sung vào các lỗ để ủ. Ở thời điểm cuối của giai đoạn ủ, các chất phản ứng không được gắn kết được loại ra từ đĩa bằng cách rửa. Tiếp đó bổ sung cơ chất enzym tạo ra sản phẩm có màu. Do AAD-1 được liên kết trong kháng thể dạng bánh kẹp, mức độ phát triển màu liên quan đến nồng độ AAD-1 trong mẫu (tức là, nồng độ gốc thấp dẫn đến sự phát triển màu chậm). Độ hấp phụ ở 405nm được đo bằng cách sử dụng máy đọc đĩa Molecular Devices V-max hoặc Spectra Max 190. Đường cong hiệu chuẩn được tạo ra và nồng độ AAD-1 trong các mẫu chưa biết được tính toán từ phương trình thoái biến đa thức bằng cách sử dụng phần mềm Soft-MAX Pro™ tương hợp với máy đọc đĩa. Các mẫu được phân tích trong hai lỗ với nồng độ trung bình của hai lỗ này được báo cáo.

Tóm tắt về các nồng độ protein AAD-1 (được lấy trung bình qua các vị trí) ở cá nên ngô khác nhau được thể hiện trên bảng 15. Nồng độ protein AAD-1 trung bình nằm trong khoảng từ 2,87ng/mg khối lượng khô ở rễ giai đoạn R1 đến 127ng/mg ở phần hoa. Kết quả biểu hiện đối với các sơ đồ không được phun và được phun là tương tự nhau. Protein AAD-1 không phát hiện được trong các mẫu đối chứng bất kỳ, ngoại trừ một mẫu rễ đối chứng từ vị trí Indiana.

Bảng 15. Tóm tắt về nồng độ trung bình mức protein AAD-1 được đo trong AAD-1 không được phun, AAD-1+Quizalofop, AAD-1+2,4-D và AAD-1+Quizalofop và 2,4-D ở mô của ngô

Ngô		AAD-1 ng/mg mô Khối lượng khô		
Mô	Xử lý	Giá trị trung bình	Std. Dev.	Khoảng giá trị
V2-V4 lá	AAD-1 Không được phun	13,4	8,00	1,98-29,9
	AAD-1 + Quizalofop	13,3	6,89	4,75-24,5
	AAD-1 + 2,4-D	14,2	7,16	4,98-26,7
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	12,3	7,09	4,07-22,5
V9 lá	AAD-1 Không được phun	5,96	2,50	2,67-10,9
	AAD-1 + Quizalofop	5,38	1,84	2,52-9,15
	AAD-1 + 2,4-D	6,37	2,41	3,03-10,9
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	6,52	2,38	3,11-11,1
R1 lá	AAD-1 Không được phun	5,57	1,66	3,47-9,34
	AAD-1 + Quizalofop	5,70	1,63	2,70-7,78
	AAD-1 + 2,4-D	5,99	1,90	2,40-9,42
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	6,06	2,27	1,55-10,2
Phần hoa	AAD-1 Không được phun	127	36,2	56,3-210
	AAD-1 + Quizalofop	108	29,9	52,2-146
	AAD-1 + 2,4-D	113	30,2	37,5-137
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	112	32,6	45,4-162
R1 rễ	AAD-1 Không được phun	2,92	1,87	0,42-6,10
	AAD-1 + Quizalofop	3,09	1,80	0,56-6,06
	AAD-1 + 2,4-D	3,92	2,03	0,91-7,62
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	2,87	1,23	1,09-5,56
R4 vỏ bắp	AAD-1 Không được phun	6,87	2,79	2,37-12,1
	AAD-1 + Quizalofop	7,16	2,84	3,05-11,6
	AAD-1 + 2,4-D	7,32	2,46	2,36-10,6
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	6,84	2,31	2,25-10,3
Cây nguyên vẹn	AAD-1 Không được phun	4,53	2,55	0,78-8,88
	AAD-1 + Quizalofop	4,61	2,22	0,75-8,77
	AAD-1 + 2,4-D	5,16	2,53	0,83-10,2
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	4,55	1,77	1,30-8,21
Hạt	AAD-1 Không được phun	5,00	1,53	2,66-8,36
	AAD-1 + Quizalofop	4,63	1,51	1,07-6,84
	AAD-1 + 2,4-D	4,98	1,78	2,94-9,10
	AAD-1 + Quizalofop và 2,4-D	4,61	1,62	1,81-7,49

^aND = giá trị nhỏ hơn phương pháp giới hạn phát hiện (LOD).

^bCác giá trị trong dấu ngoặc đơn nằm giữa phương pháp LOD và giới hạn định lượng (Limit of Quantitation - LOQ).

Ví dụ 6.6. Phân tích thành phần

Các mẫu vỏ bắp và hạt ngô được phân tích về hàm lượng dinh dưỡng với nhiều thử nghiệm. Các phân tích được thực hiện đối với vỏ bắp bao gồm hàm lượng tro, tổng chất béo, độ ẩm, protein, hydrat cacbon, xơ thô, xơ axit (acide detergent xơ), xơ trung tính, canxi và phospho. Các phân tích được thực hiện đối với hạt ngô bao gồm thành phần (hàm lượng tro, tổng chất béo, độ ẩm, protein, hydrat cacbon, xơ thô, xơ axit (acide detergent xơ)), xơ trung tính (neutral detergent xơ - NDF), khoáng chất, các axit amin, axit béo, vitamin, chất chuyển hóa thứ cấp và chất kháng dinh dưỡng. Các kết quả của phép phân tích dinh dưỡng đối với vỏ bắp và hạt ngô so với các giá trị được báo cáo trong tài liệu (xem; Watson, 1982 (4); Watson, 1984 (5); ILSI Crop Composition DataBase, 2006 (6); OECD Consensus Document on Compositional Considerations for maize, 2002 (7); và Codex Alimentarius Commission 2001 (8)).

Ví dụ 6.6.1. Phân tích thành phần, xơ và khoáng về vỏ bắp

Phân tích về protein, chất béo, tro, độ ẩm, hydrat cacbon, ADF, NDF, canxi và phospho ở các mẫu vỏ bắp từ ngô đối chứng, không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + được phun cả hai được thực hiện. Tóm tắt về các kết quả qua tất cả các vị trí được thể hiện trên bảng 16. Đối với phân tích vị trí chéo và vị trí riêng lẻ, tất cả các giá trị trung bình của các thành phần, xơ và khoáng nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu. Không quan sát được sai khác có ý nghĩa thống kê ở phân tích vị trí chéo giữa mẫu đối chứng và mẫu chuyển gen về độ ẩm, ADF, NDF, canxi và phospho. Đối với protein và tro, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với không được phun AAD-1 (protein), AAD-1 + quizalofop (protein), và AAD-1 + được phun cả hai (tro), nhưng không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc các giá trị P được điều chỉnh FDR. Đối với chất béo, cả hai cặp thử nghiệm t có ý nghĩa và được điều chỉnh giá trị P quan sát được đối với AAD-1 + quizalofop so với mẫu đối chứng, nhưng không quan sát được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa. Đối với hydrat cacbon, hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa thống kê, cặp thử nghiệm t và FDR được điều chỉnh giá trị P quan sát được giữa AAD-1 + quizalofop và mẫu đối chứng. Còn đối với hydrat cacbon, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với mẫu không được phun AAD-1, nhưng không có FDR có ý

nghĩa được điều chỉnh giá trị P. Các sai khác này không có ý nghĩa sinh học vì kết quả của vị trí chéo đối với các đặc điểm phân tích này đều nằm trong khoảng giá trị trong tài liệu đã được báo cáo đối với ngô, và sai khác với ngô đối chứng là nhỏ (<23%).

Bảng 16. Tóm tắt về phân tích thành phần, xơ và khoáng về vỏ bắp ở tất cả các vị trí.

Thành phần (% khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^a	Hiệu quả xử lý toàn bộ (Pr>F) ^b	Đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Protein	3,14-15,9	(0,054)	7,65	6,51 (0,016 ^e , 0,066)	6,41 (0,010 ^e , 0,051)	7,17 (0,285, 0,450)	7,13 (0,245, 0,402)
Chất béo	0,296-6,7	(0,068)	2,29	2,08 (0,202, 0,357)	1,78 (0,005 ^e , 0,028 ^e)	2,10 (0,233, 0,391)	2,01 (0,093, 0,213)
Tro	1,3-10,5	(0,072)	3,90	3,84 (0,742, 0,859)	4,03 (0,525, 0,708)	3,99 (0,673, 0,799)	4,40 (0,019 ^e , 0,069)
Độ ẩm	53,3-87,5	(0,819)	69,5	69,2 (0,651, 0,782)	69,5 (0,988, 0,988)	69,8 (0,699, 0,820)	70,0 (0,501, 0,687)
Hydrat cacbon	66,9-94,5	(0,026 ^e)	86,1	87,6 (0,015 ^e , 0,061)	87,8 (0,006 ^e , 0,034 ^e)	86,8 (0,262, 0,424)	86,5 (0,538, 0,708)

Xơ

(% khối lượng khô)

Xơ axit (ADF)	16,1-47,4	(0,968)	26,5	26,6 (0,925, 0,970)	26,8 (0,833, 0,925)	26,0 (0,677, 0,800)	26,8 (0,851, 0,937)
Xơ trung tính (NDF)	20,3-63,7	(0,345)	41,6	43,6 (0,169, 0,322)	43,3 (0,242, 0,402)	41,3 (0,809, 0,911)	41,6 (0,978, 0,985)

Khoáng chất

(% khối lượng khô)

Canxi	0,071-0,6	(0,321)	0,212	0,203 (0,532, 0,708)	0,210 (0,930, 0,970)	0,215 (0,815, 0,911)	0,231 (0,150, 0,296)
Phospho	0,094-0,55	(0,163)	0,197	0,189 (0,198, 0,354)	0,202 (0,427, 0,615)	0,203 (0,288, 0,450)	0,200 (0,608, 0,762)

^aKhoảng kết hợp.

^bHiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^cSo sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.

^dCác giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^eSai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.

Ví dụ 6.6.2. Phân tích thành phần và xơ của hạt

Tóm tắt về kết quả đối với các thành phần (protein, chất béo, tro, độ ẩm, cholesterol và hydrat cacbon) và xơ (ADF, NDF và tổng chất xơ) ở hạt ngô qua tất cả các vị trí được thể hiện trên bảng 17. Tất cả các kết quả về thành phần và xơ nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu, và không có sự sai khác có ý nghĩa về phân tích vị trí chéo quan sát được giữa đối chứng và mẫu chuyển gen đối với chất béo, tro, NDF và tổng chất xơ. Đối với độ ẩm, quan sát được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa, nhưng không đi liền với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa hoặc các giá trị P được điều chỉnh FDR. Đối với ADF, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với AAD-1 + cả hai, nhưng không quan sát được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc FDR được điều chỉnh giá trị P. Đối với cả protein và hydrat cacbon, đã phát hiện được các cặp thử nghiệm có ý nghĩa, được điều chỉnh các giá trị P và hiệu quả xử lý chung đối với mẫu không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, và AAD-1 + cả hai. Do các sai khác này là nhỏ ($< 12\%$) và tất cả các giá trị nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu, các sai khác này không được xem là có nghĩa sinh học.

Bảng 17.

Tóm tắt về phân tích thành phần và xơ của hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Thành phần (% khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^a	Hiệu quả xử lý toàn bộ ($Pr > F$) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	được phun 2,4- D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Protein	6-17,3	(0,003 ^e)	9,97	10,9 (0,002 ^e , 0,016 ^e)	11,1 (0,0004 ^e , 0,013 ^e)	10,5 (0,061, 0,161)	10,9 (0,002 ^e , 0,015 ^e)
Chất béo	1,2-18,8	(0,369)	4,26	4,19 (0,238, 0,397)	4,16 (0,095, 0,215)	4,26 (0,955, 0,977)	4,22 (0,427, 0,615)

Tro	0,62-6,28	(0,553)	1,45	1,55 (0,178, 0,330)	1,52 (0,364, 0,557)	1,45 (0,982, 0,985)	1,51 (0,397, 0,587)
Độ ẩm	6,1-40,5	(0,038 ^e)	25,1	25,5 (0,406, 0,594)	24,4 (0,056, 0,152)	24,5 (0,117, 0,254)	24,5 (0,114, 0,250)
Cholesterol	NR ^f	NA ^g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Hydrat cacbon	63,3-89,8	(0,005 ^e)	84,3	83,3 (0,002 ^e , 0,015 ^e)	83,2 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	83,8 (0,074, 0,185)	83,4 (0,003 ^e , 0,019 ^e)

Xơ (% khối lượng khô)

Xơ axit (ADF)	1,82-11,3	(0,247)	4,23	3,94 (0,130, 0,269)	3,99 (0,197, 0,354)	3,89 (0,078, 0,193)	3,82 (0,035 ^e , 0,106)
Xơ trung tính (NDF)	5,59-22,6	(0,442)	10,6	10,3 (0,455, 0,638)	9,89 (0,120, 0,254)	9,90 (0,121, 0,254)	10,3 (0,552, 0,708)
Tổng chất xơ	8,3-35,3	(0,579)	13,4	12,8 (0,164, 0,313)	12,9 (0,195, 0,353)	13,1 (0,487, 0,679)	12,9 (0,215, 0,370)

^a Khoảng kết hợp.

^b Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^c So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.

^d Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

^f NR = không được báo cáo.

^g NA = Phân tích thống kê không được thực hiện vì phần lớn các dữ liệu này là < LOQ.

Ví dụ 6.6.3 Phân tích khoáng của hạt

Phân tích các mẫu hạt ngô về khoáng chất canxi, crom, đồng, iot, sắt, magie, mangan, molybden, phospho, kali, selen, natri, và kẽm được thực hiện. Tóm tắt về các kết quả qua tất cả các vị trí được thể hiện trên bảng 18. Tất cả các kết quả đều nằm trong khoảng giá trị của tài liệu đã được báo cáo. Đối với phân tích vị trí chéo, không quan sát được sai khác có ý nghĩa đối với canxi, đồng, sắt, và kali. Kết quả trung bình đối với crom, iot, selen và natri nằm dưới ngưỡng định lượng của phương pháp. Đối với magie và phospho, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với mẫu không được phun AAD-1 và AAD-1 + quizalofop, nhưng không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc các giá trị P được điều chỉnh FDR. Đối với mangan và molybden, quan sát được cặp thử

thực nghiệm t có ý nghĩa đối với mẫu không được phun AAD-1, nhưng không quan sát được FDR được điều chỉnh giá trị P có ý nghĩa và hiệu quả xử lý chung. Đối với mẫu được phun AAD-1 + cả hai, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với kẽm, nhưng không có giá trị P được điều chỉnh FDR có ý nghĩa hoặc hiệu quả xử lý chung. Ngoài ra, các sai khác này với ngô đối chứng là nhỏ (< 13%), và tất cả các giá trị nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu, khi có thể.

Bảng 18. Tóm tắt về phân tích khoáng của hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Khoáng chất (mg/100g dry wt.)	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^a	Hiệu quả xử lý toàn bộ (Pr>F) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4- D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Canxi	1,27-100	(0,493)	4,05	4,21 (0,146, 0,289)	4,12 (0,505, 0,687)	4,04 (0,944, 0,977)	4,06 (0,898, 0,957)
Crom	0,006- 0,016	NA ^e	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
đồng	0,073- 1,85	(0,963)	0,144	0,151 (0,655, 0,782)	0,146 (0,890, 0,957)	0,141 (0,817, 0,911)	0,149 (0,749, 0,863)
Iot	7,3-81	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Sắt	0,1-10	(0,333)	2,49	2,60 (0,086, 0,206)	2,56 (0,310, 0,482)	2,51 (0,801, 0,911)	2,59 (0,145, 0,289)
Magie	59,4- 1000	(0,072)	122	129 (0,010 ^f , 0,051)	128 (0,017 ^f , 0,066)	126 (0,145, 0,289)	127 (0,070, 0,177)
Mangan	0,07-5,4	(0,099)	0,525	0,551 (0,025 ^f , 0,082)	0,524 (0,884, 0,957)	0,526 (0,942, 0,977)	0,532 (0,505, 0,687)
Molipđen	NR	(0,143)	261	229 (0,020 ^f , 0,072)	236 (0,067, 0,173)	244 (0,206, 0,362)	234 (0,046, 0,132)
Phospho	147-750	(0,102)	289	303 (0,012 ^f , 0,057)	300 (0,035 ^f , 0,106)	299 (0,055, 0,150)	298 (0,085, 0,206)
Kali	181-720	(0,453)	362	368 (0,330, 0,510)	359 (0,655, 0,782)	364 (0,722, 0,839)	357 (0,454, 0,638)

Selen	0,001-0,1	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Natri	0-150	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Kẽm	0,65-3,72	(0,166)	2,26	2,32 (0,183, 0,336)	2,34 (0,108, 0,238)	2,29 (0,627, 0,768)	2,37 (0,027 ^f , 0,085)

^a Khoảng kết hợp.

^b Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^c So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.

^d Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e NA= Phân tích thống kê không được thực hiện vì phần lớn các dữ liệu này là < LOQ.

^f Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

Ví dụ 6.6.4. Phân tích axit amin của hạt

Các mẫu ngô được phân tích về hàm lượng axit amin trong mẫu đối chứng, không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + phun cả hai, và tóm tắt về các kết quả trên tất cả các vị trí và bằng vị trí trường riêng lẻ được thể hiện trong bảng 19. Tất cả các mức axit amin đều nằm trong khoảng giá trị trong tài liệu đã được báo cáo, và không quan sát được sự sai khác có ý nghĩa về phân tích vị trí chéo đối với arginin, lysin, và tyrosin. Quan sát được sai khác có ý nghĩa đối với một số axit amin trong phân tích vị trí chéo. Trong các biến thể gen này, hàm lượng axit amin của mẫu đối chứng là thấp hơn các dòng chuyển gen AAD-1, có thể liên quan đến toàn bộ hàm lượng protein thấp hơn trong hạt đối chứng so với dòng AAD-1. Đối với mẫu không được phun AAD-1, đã phát hiện được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa cùng với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa và các giá trị P được điều chỉnh FDR ở tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, glyxin, lysin, tryptophan và tyrosin. Đối với mẫu AAD-1 + quizalofop, đã phát hiện được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa cùng với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa và các giá trị P được điều chỉnh FDR ở tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, xystein, glyxin, lysin, tryptophan và tyrosin. Đối với mẫu AAD-1 + 2,4-D, đã phát hiện được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa cùng với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa (với các giá trị P được điều chỉnh FDR có ý nghĩa) ở tất cả các axit amin ngoại trừ arginin, aspartic axit, glyxin, histidin, lysin, tyrosin và valin. Đối với mẫu AAD-1 + cả hai, đã phát hiện được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa cùng với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa và các giá trị P được điều chỉnh FDR ở tất cả các axit amin ngoại trừ

arginin, glyxin, lysin, serin, tryptophan và tyrosin. Mặc dù đã quan sát được rất nhiều sai khác đối với các axit amin, các sai khác là nhỏ ($< 15\%$), không quan sát được ở tất cả các vị trí, và tất cả các giá trị trung bình đều nằm trong khoảng giá trị trong tài liệu đã được báo cáo.

Bảng 19. Tóm tắt về phân tích axit amin về hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Axit amin (% khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^a	Hiệu quả xử lý chung ($P > F$) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun 2,4- D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun cả hai loại (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d
Alanin	0,44- 1,39	(0,002 ^e)	0,806	0,901 (0,0005 ^e , 0,013 ^e)	0,900 (0,0005 ^e , 0,013 ^e)	0,863 (0,021 ^e , 0,074)	0,894 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Arginin	0,12- 0,64	(0,371)	0,486	0,499 (0,286, 0,450)	0,505 (0,139, 0,283)	0,487 (0,929, 0,970)	0,484 (0,897, 0,957)
Aspartic Axit	0,34- 1,21	(0,010 ^e)	0,712	0,768 (0,002 ^e , 0,015 ^e)	0,764 (0,003 ^e , 0,021 ^e)	0,743 (0,060, 0,160)	0,762 (0,004 ^e , 0,027 ^e)
Xystein	0,08- 0,51	(0,033 ^e)	0,213	0,225 (0,009 ^e , 0,050 ^e)	0,223 (0,020 ^e , 0,072)	0,223 (0,018 ^e , 0,067)	0,226 (0,005 ^e , 0,028 ^e)
Axit glutamic	0,97- 3,54	(0,001 ^e)	1,97	2,22 (0,0003 ^e , 0,013 ^e)	2,21 (0,0004 ^e , 0,013 ^e)	2,12 (0,017 ^e , 0,067)	2,20 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Glyxin	0,18- 0,54	(0,052)	0,383	0,397 (0,018 ^e , 0,067)	0,398 (0,013 ^e , 0,059)	0,390 (0,217, 0,371)	0,397 (0,016 ^e , 0,066)
Histidin	0,14- 0,43	(0,005 ^e)	0,283	0,303 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,302 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,295 (0,036, 0,109)	0,302 (0,002 ^e , 0,014 ^e)
Isoloxin	0,18- 0,71	(0,003 ^e)	0,386	0,427 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,427 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,410 (0,044 ^e , 0,127)	0,431 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Loxin	0,64- 2,49	(0,001 ^e)	1,35	1,54 (0,0003 ^e , 0,013 ^e)	1,54 (0,0003 ^e , 0,013 ^e)	1,47 (0,013 ^e , 0,059)	1,53 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Lysin	0,05- 0,56	(0,211)	0,310	0,315 (0,210, 0,367)	0,316 (0,128, 0,265)	0,309 (0,879, 0,956)	0,316 (0,102, 0,226)

Methionin	0,10-0,47	(0,003 ^e)	0,195	0,209 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,209 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,205 (0,014 ^e , 0,061)	0,208 (0,001 ^e , 0,014 ^e)
Phenylalanin	0,24-0,93	(0,002 ^e)	0,551	0,617 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,619 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,592 (0,023 ^e , 0,077)	0,615 (0,001 ^e , 0,013 ^e)
Prolin	0,46-1,63	(0,002 ^e)	0,910	1,01 (0,0004 ^e , 0,013 ^e)	1,01 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,975 (0,012 ^e , 0,059)	0,997 (0,001 ^e , 0,014 ^e)
Serin	0,24-0,91	(0,009 ^e)	0,498	0,550 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,550 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,529 (0,042 ^e , 0,122)	0,536 (0,015 ^e , 0,061)
Axit amin (% khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Giá trị ^a	Hiệu quả xử lý tổng (Pr>F) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun Both (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Threonin	0,22-0,67	(0,005 ^e)	0,364	0,394 (0,001 ^e , 0,014 ^e)	0,394 (0,001 ^e , 0,013 ^e)	0,384 (0,023 ^e , 0,077)	0,390 (0,003 ^e , 0,020 ^e)
Tryptophan	0,03-0,22	(0,088)	0,052	0,055 (0,067, 0,173)	0,056 (0,025 ^e , 0,082)	0,056 (0,014 ^e , 0,060)	0,056 (0,029 ^e , 0,092)
Tyrosin	0,10-0,79	(0,390)	0,336	0,355 (0,535, 0,708)	0,375 (0,214, 0,370)	0,339 (0,907, 0,964)	0,314 (0,500, 0,687)
Valin	0,21-0,86	(0,005 ^e)	0,495	0,537 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,538 (0,002 ^e , 0,014 ^e)	0,519 (0,054, 0,148)	0,538 (0,001 ^e , 0,014 ^e)

^a Khoảng kết hợp.

^b Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^c So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.

^d Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

Ví dụ 6.6.5. Phân tích axit béo của hạt

Phân tích về các mẫu hạt ngô về axit béo được thực hiện. Tóm tắt về các kết quả qua tất cả các vị trí được thể hiện trên bảng 20. Tất cả các kết quả đối với mẫu đối chứng, mẫu không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + mẫu được phun tất cả được phân tích về các axit béo này đều nằm trong khoảng giá trị trong các tài liệu đã được công bố. Các kết quả đối với caprylic (8:0), capric (10:0), lauric (12:0),

myristic (14:0), myristoleic (14:1), pentadecanoic (15:0), pentadexenoic (15:1), heptadecanoic (17:0), heptadexenoic (17:1), gamma linolenic (18:3), eicosadienoic (20:2), eicosatrienoic (20:3), và arachidonic (20:4) là theo phương pháp Giới hạn định lượng (Limit of Quantitation - LOQ). Trong phân tích vị trí chéo, không quan sát được sai khác có ý nghĩa đối với 16:0 palmitic, 16:1 pamitoleic, 18:0 stearic, 18:2 linoleic, 18:3 linolenic, và 20:0 arachidic. Đối với 18:1 oleic và 20:1 eicosenoic, quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với không được phun AAD-1 (18:1) và AAD-1 + 2,4-D (18:1 và 20:1), nhưng không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc các giá trị P được điều chỉnh FDR. Đối với 22:0 behenic, phát hiện ra hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa và cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + phun cả hai, nhưng không có các giá trị P được điều chỉnh FDR có ý nghĩa.

Bảng 20. Tóm tắt về phân tích axit béo của hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Axit béo (% tổng axit béo) ^a	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^b	Hiệu quả xử lý chung (Pr>F) ^c	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^e	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4- D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
8:0 Caprylic	0,13– 0,34	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
10:0 Capric	ND	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
12:0 Lauric	ND– 0,687	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
14:0 Myristic	ND-0,3	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
14:1 Myristoleic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
15:0 Pentadecanoic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
15:1 Pentadexenoic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
16:0 Palmitic	7–20,7	(0,559)	9,83	9,88 (0,618, 0,763)	9,95 (0,280, 0,445)	9,78 (0,617, 0,763)	9,90 (0,544, 0,708)
16:1 Palmitoleic	ND–1,0	(0,552)	0,056	0,044 (0,804,	0,047 (0,551,	0,041 (0,555,	0,079 (0,392,

				0,911)	0,708)	0,708)	0,582)
17:0 Heptadecanoic	ND-0,11	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
17:1 Heptadexenoic	ND- 0,1	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
18:0 Stearic	ND-3,4	(0,561)	2,04	1,98 (0,119, 0,254)	2,01 (0,437, 0,626)	2,00 (0,259, 0,421)	2,02 (0,598, 0,756)
18:1 Oleic	17,4 - 46	(0,076)	31,3	30,4 (0,013 ^g , 0,059)	30,8 (0,178, 0,329)	30,4 (0,015 ^g , 0,061)	30,7 (0,092, 0,213)
18:2 Linoleic	34,0-70	(0,474)	47,5	48,3 (0,189, 0,345)	48,4 (0,144, 0,289)	48,0 (0,453, 0,638)	48,5 (0,119, 0,254)
18:3 Gamma Linolenic	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Axit béo (% tổng axit béo) ^a	Giá trị lý thuyết Giá trị ^b	Hiệu quả xử lý toàn bộ (Pr>F) ^c	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^e	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4- D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
18:3 Linolenic	ND-2,25	(0,479)	1,04	1,05 (0,537, 0,708)	1,06 (0,202, 0,357)	1,04 (0,842, 0,932)	1,06 (0,266, 0,428)
20:0 Arachidic	0,1-2	(0,379)	0,400	0,386 (0,061, 0,161)	0,393 (0,341, 0,525)	0,390 (0,153, 0,297)	0,390 (0,175, 0,328)
20:1 Eicosenoic	0,17- 1,92	(0,107)	0,232	0,226 (0,089, 0,210)	0,230 (0,497, 0,687)	0,223 (0,013 ^g , 0,059)	0,227 (0,121, 0,254)
20:2 Eicosadienoic	ND-0,53	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
20:3 Eicosatrienoic	0,275	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
20:4 Arachidonic	0,465	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
22:0 Behenic	ND-0,5	(0,044 ^g)	0,136	0,088 (0,093, 0,213)	0,076 (0,887, 0,957)	0,086 (0,011 ^g , 0,054)	0,108 (0,023 ^g , 0,077)

^a Kết quả được chuyển hóa từ đơn vị % khối lượng khô thành % axit béo.

^b Khoảng kết hợp.

^c Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

- ^d So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.
- ^e Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).
- ^f NA= Phân tích thống kê không được thực hiện vì phần lớn các dữ liệu này là < LOQ.
- ^g Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.

Ví dụ 6.6.6. Phân tích vitamin của hạt

Mức vitamin A, B1, B2, B5, B6, B12, C, D, E, niacin, và axit folic ở các mẫu hạt ngô từ ngô đối chứng, không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + được phun cả hai được xác định. Tóm tắt về các kết quả qua tất cả các vị trí được thể hiện trên Bảng 21. Vitamin B12, D và E không thể định lượng được bằng các phương pháp phân tích được sử dụng. Tất cả các kết quả trung bình đã được báo cáo đối với vitamin là tương tự với các giá trị lý trong tài liệu đã được báo cáo, khi có thể. Các kết quả đối với vitamin mà không có khoảng giá trị trong tài liệu đã được báo cáo (vitamin B5 và C) là tương tự với các giá trị đối chứng thu được (sai khác < 22% so với mẫu đối chứng). Đối với phân tích vị trí chéo, không quan sát được sai khác có ý nghĩa thống kê, ngoại trừ vitamin B1, C và niacin. Quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với vitamin B1 giữa ngô đối chứng và không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, và AAD-1 + được phun toàn bộ, nhưng không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc các giá trị P được điều chỉnh FDR. Đối với vitamin C, quan sát được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa cùng với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa và các giá trị P được điều chỉnh FDR đối với AAD-1 + quizalofop và AAD-1 + 2,4-D. Tương tự, đối với niacin, quan sát được hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa cùng với cặp thử nghiệm t có ý nghĩa và các giá trị P được điều chỉnh FDR đối với AAD-1 + quizalofop và AAD-1 + cả hai. Cũng phát hiện được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với AAD-1 + 2,4-D đối với niacin đối với AAD-1 + 2,4-D, nhưng không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc FDR được điều chỉnh giá trị P. Do không quan sát được các sai khác qua các vị trí và các giá trị nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu (khi có thể), các sai khác này không được xem là có nghĩa sinh học.

Bảng 21. Tóm tắt về phân tích thành phần vitamin của hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Vitamin (mg/kg khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Giá trị ^a	Hiệu quả xử lý chung (Pr>F) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4- D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Beta Carotene (Vitamin A)	0,19 – 46,8	(0,649)	1,80	1,85 (0,372, 0,566)	1,80 (0,967, 0,983)	1,82 (0,770, 0,883)	1,87 (0,221, 0,376)
Vitamin B1 (Thiamin)	1,3 - 40	(0,068)	3,47	3,63 (0,041 ^e , 0,121)	3,67 (0,013 ^e , 0,059)	3,54 (0,375, 0,567)	3,64 (0,032 ^e , 0,100)
Vitamin B2 (Riboflavin)	0,25 - 5,6	(0,803)	2,15	2,05 (0,443, 0,631)	2,08 (0,600, 0,756)	1,99 (0,227, 0,383)	2,07 (0,543, 0,708)
Vitamin B5 (Axit pantothenic)	NR ^f	(0,820)	5,28	5,17 (0,623, 0,766)	5,09 (0,391, 0,582)	5,29 (0,968, 0,983)	5,10 (0,424, 0,615)
Vitamin B6 (Pyridoxine)	3,68 – 11,3	(0,431)	6,52	6,57 (0,859, 0,938)	6,66 (0,652, 0,782)	6,66 (0,652, 0,782)	7,08 (0,088, 0,210)
Vitamin B12	NR	NA ^g	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Vitamin C	NR	(0,018 ^e)	22,4	21,2 (0,268, 0,429)	17,5 (0,005 ^e , 0,028 ^e)	18,0 (0,004 ^e , 0,026 ^e)	20,4 (0,068, 0,173)
Vitamin D	NR	NA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Vitamin E (alpha Tocopherol)	1,5 - 68,7	(0,558)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Niacin (Axit nicotinic, Vitamin B3)	9,3 - 70	(0,013 ^e)	26,1	24,2 (0,050, 0,140)	22,9 (0,002 ^e , 0,017 ^e)	23,7 (0,018 ^e , 0,067)	22,9 (0,002 ^e , 0,016 ^e)
Axit folic	0,15 - 683	(0,881)	0,594	0,588 (0,779, 0,890)	0,574 (0,403, 0,592)	0,592 (0,931, 0,970)	0,597 (0,916, 0,970)

^a Khoảng kết hợp.^b Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.^c So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.^d Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).^e Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị P < 0,05.

^f NR = không được báo cáo.

^g NA= Phân tích thống kê không được thực hiện vì phần lớn các dữ liệu này là < LOQ.

Ví dụ 6.6.7. Phân tích chất kháng dinh dưỡng và chất chuyển hóa thứ cấp của hạt

Mức chất chuyển hóa thứ cấp (axit coumaric, axit ferulic, furfural và inositol) và chất kháng dinh dưỡng (chất ức chế axit phytic, raffinosa, và trypsin) ở các mẫu hạt ngô từ ngô đối chứng, không được phun AAD-1, AAD-1 + quizalofop, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + phun tất cả được xác định. Tóm tắt về các kết quả qua tất cả các vị trí được thể hiện trên bảng 22 và 23. Đối với phân tích vị trí chéo, tất cả các giá trị nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu. Quan sát được không có sai khác có ý nghĩa giữa mẫu AAD-1 và mẫu đối chứng kết quả ở phân tích vị trí chéo đối với chất ức chế inositol và trypsin. Các kết quả đối với furfural và raffinosa là theo phương pháp giới hạn định lượng. Quan sát được cặp thử nghiệm t có ý nghĩa đối với axit coumaric (không được phun AAD-1, AAD-1 + 2,4-D và AAD-1 + được phun cả hai), và axit ferulic (AAD-1 + quizalofop và AAD-1 + được phun cả hai). Các sai khác này không đi liền với hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa hoặc các giá trị P được điều chỉnh FDR và là tương tự với đối chứng (sai khác < 10%). Đã phát hiện ra hiệu quả xử lý chung có ý nghĩa, cặp thử nghiệm t, và FDR được điều chỉnh giá trị P đối với axit phytic (không được phun AAD-1). Do tất cả các kết quả nằm trong khoảng giá trị nêu trong tài liệu và tương tự với đối chứng (sai khác < 11%), các sai khác này không được xem là có nghĩa sinh học.

Bảng 22. Tóm tắt về phân tích chất chuyển hóa thứ cấp của hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Chất chuyển hóa thứ cấp (% khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^a	Hiệu quả xử lý chung (Pr>F) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Axit coumaric	0,003-0,058	(0,119)	0,021	0,020 (0,038 ^e , 0,113)	0,020 (0,090, 0,211)	0,019 (0,022 ^e , 0,074)	0,020 (0,029 ^e , 0,091)
Axit ferulic	0,02-0,389	(0,077)	0,208	0,199 (0,051, 0,141)	0,196 (0,010 ^e , 0,051)	0,200 (0,080, 0,196)	0,197 (0,019 ^e , 0,069)
Furfural	0,0003-0,0006	NA ^f	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Inositol	0,0089- 0,377	(0,734)	0,218	0,224 (0,548, 0,708)	0,218 (0,973, 0,984)	0,213 (0,612, 0,763)	0,211 (0,526, 0,708)
----------	------------------	---------	-------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

^a Khoảng kết hợp.

^b Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^c So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.

^d Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.

^f NA= Phân tích thống kê không được thực hiện vì phần lớn các dữ liệu này là $< LOQ$.

Bảng 23. Tóm tắt về phân tích chất kháng dinh dưỡng của hạt ngô ở tất cả các vị trí.

Chất kháng dinh dưỡng (% khối lượng khô)	Giá trị lý thuyết Các giá trị ^a	Hiệu quả xử lý chung ($Pr > F$) ^b	Mẫu đối chứng	Không được phun (giá trị P, ^c Giá trị P được điều chỉnh) ^d	Được phun Quizalofop (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun 2,4-D (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)	Được phun cả hai (giá trị P, Giá trị P được điều chỉnh)
Axit phytic	0,11- 1,57	(0,046 ^e)	0,727	0,806 (0,003 ^e , 0,020 ^e)	0,767 (0,099, 0,224)	0,755 (0,245, 0,402)	0,761 (0,158, 0,304)
Raffinoza	0,02- 0,32	NA ^f	$< LOQ$	$< LOQ$	$< LOQ$	$< LOQ$	$< LOQ$
Chất ức chế Trypsin (TIU/mg)	1,09- 7,18	(0,742)	5,08	5,10 (0,954, 0,977)	4,87 (0,631, 0,770)	5,45 (0,387, 0,582)	5,18 (0,813, 0,911)

^a Khoảng kết hợp.

^b Hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm F.

^c So sánh giữa các mẫu xử lý chuyển gen với mẫu đối chứng bằng cách sử dụng các thử nghiệm t.

^d Các giá trị P được điều chỉnh bằng cách sử dụng quy trình Tỷ lệ phát hiện sai (False Discovery Rate - FDR).

^e Sai khác có ý nghĩa thống kê đã chỉ ra bởi giá trị $P < 0,05$.

^f NA= Phân tích thống kê không được thực hiện vì phần lớn các dữ liệu này là $< LOQ$.

Ví dụ 7. Thử nghiệm nông học bổ sung

Các đặc tính nông học của dòng ngô 40278 so với a dòng ngô gần đẳng giá trị được đánh giá qua các môi trường khác nhau. Các xử lý bao gồm 4 thể lai khác biệt về mặt di truyền và thể lai đối chứng gần đẳng giá trị thích hợp của chúng được thử nghiệm qua tổng 21 vị trí.

Bốn thể lai thử nghiệm là trung gian cho các thể lai có tính thuần thực muộn với tính thuần thực tương đối nằm trong khoảng từ 99 đến 113 ngày. Thử nghiệm A được thử nghiệm biến thể gen DAS-40278-9 trong chuyển hoá Inbred C x BC3S1 cơ sở di truyền. Thể lai này có tính thuần thực tương đối là 109 ngày và được thử nghiệm ở 16 vị trí (Bảng 24). Thử nghiệm B được thử nghiệm chuyển hoá Inbred E x BC3S1 cơ sở thể lai, thể lai có tính thuần thực tương đối 113 ngày. Thể lai này được thử nghiệm ở 14 vị trí, bằng cách sử dụng nhóm vị trí hơi khác nhau so với Thử nghiệm A (Bảng 24). Thử nghiệm C và D được thử nghiệm lần lượt chuyển hoá BC2S1 cơ sở thể lai x chuyển hóa Inbred D và BC2S1 x Inbred F. Cả hai thể lai này đều có tính thuần thực tương đối 99 ngày và được thử nghiệm ở 10 vị trí biến thể gen nhau.

Bảng 24. Vị trí thử nghiệm nông học

Vị trí	Thử nghiệm			
	2A	2B	2C	2D
Atlantic, IA	X	X		
Fort Dodge, IA	X	X	X	X
Huxley, IA	X	X	X	X
Nora Springs, IA	X			
Wyman, IA	X	X		
Lincoln, IL		X		
Pontiac, IL	X	X	X	X
Princeton, IL	X	X		
Seymour, IL	X			
Shannon, IL	X		X	X
Viola, IL	X	X		
Bremen, IN	X	X	X	X
Evansville, IN		X		
Fowler, IN	X	X	X	X
Mt. Vernon, IN		X		
Olivia, MN			X	X
Wayne, NE	X	X		
York, NE	X	X		
Arlington, WI	X		X	X
Patteville, WI	X		X	X
Watertown, WI			X	X

Đối với mỗi thử nghiệm, thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên được sử dụng hai lần cho mỗi vị trí và hai sơ đồ luống. Chiều dài luống là 20 feet và mỗi luống được gieo hạt ở tỷ lệ 34 hạt cho mỗi luống. Ứng dụng thực tiễn theo vùng chuẩn được sử dụng trong quản lý các thử nghiệm này.

Dữ liệu được thu gom và được phân tích về tám đặc tính nông học; chiều cao của cây, chiều cao tai, vị trí tạm thời của cuống, vị trí tạm thời của rễ, quần thể cuối, độ ẩm của hạt, khối lượng thử nghiệm, và hiệu suất. Các thông số chiều cao của cây và chiều cao tai cung cấp thông tin khoảng hình thái học của các thể lai. Các đặc tính nông học của percent vị trí tạm thời của cuống và vị trí tạm thời của rễ xác định độ ổn định thu hoạch của thể lai. Đếm quần thể cuối để đo chất lượng hạt và các điều kiện sinh trưởng theo mùa ảnh hưởng đến hiệu suất. Phần trăm độ ẩm của hạt khi thu hoạch xác định tính thuần thực của thể lai, và hiệu suất (gạ/mẫu Anh được điều chỉnh cho độ ẩm) và khối lượng thử nghiệm (khối lượng tính theo bao của một gạ ngô được điều chỉnh đến độ ẩm 15,5%) mô tả khả năng sinh sản của thể lai.

Phân tích về phương sai được tiến hành qua các vị trí trường bằng cách sử dụng kiểu tuyến tính. Mẫu và vị trí bao gồm trong kiểu ở dạng hiệu quả cố định. Các kiểu hỗn hợp bao gồm vị trí và định vị bởi hiệu quả ngẫu nhiên được khảo sát, nhưng định vị bởi mẫu chỉ được giải thích phần nhỏ của phương sai và thành phần phương sai của nó thường không khác nhau đáng kể từ số không. Đối với stock và vị trí tạm thời của rễ biến nạp theo loga được sử dụng để làm ổn định phương sai, tuy nhiên giá trị trung bình và khoảng giá trị được báo cáo trên thang chia ban đầu. Sai khác có ý nghĩa được hiển thị ở mức tin cậy 95%. Mức ý nghĩa của hiệu quả xử lý chung được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm t

Kết quả của các thử nghiệm xác định đặc điểm nông học này có thể được tìm thấy trong bảng 2. Đã không phát hiện ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê đối với bất kỳ thể lai nào trong số bốn thể lai 40278 so với các mẫu đối chứng đẳng giá trị (ở $p < 0,05$) đối với các thông số về chiều cao tai, vị trí tạm thời của cuống, vị trí tạm thời của rễ, độ ẩm của hạt, khối lượng thử nghiệm, và hiệu suất. Số lượng quần thể cuối và chiều cao của cây là sai khác có tính thống kê lần lượt trong Thử nghiệm A và B, nhưng không quan sát được sự sai khác tương tự khi so sánh với các thể lai 40278 khác được thử nghiệm. Một số biến dị quan sát được có thể là do biến dị di truyền ở mức thấp duy trì từ biến thể gen lai chéo ngược DAS-40278-9 vào các dòng lai nội phối loại ưu. Toàn bộ khoảng giá trị của các thông số đo được đều nằm trong khoảng các giá trị thu được đối với ngô lai truyền thống. Tóm lại, dữ liệu xác định đặc điểm nông học cho thấy rằng ngô 40278 là tương đương về mặt sinh học với ngô thông thường.

Bảng 25. Phân tích về các đặc tính nông học

Thử nghiệm A

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Giá trị trung bình	Khoảng giá trị		Giá trị P
			Tối thiểu	Tối đa	
Chiều cao của cây (inso)	AAD-1	96,31	94,00	99,00	0,6174
	đối chứng	95,41	95,00	98,00	
Chiều cao tai (inso)	AAD-1	41,08	30,00	48,00	0,4538
	đối chứng	44,42	40,00	47,00	
Vị trí tạm thời của cuống (%)	AAD-1	3,64	0,00	27,70	0,2020
	đối chứng	2,49	0,00	28,57	
Vị trí tạm thời của rễ (%)	AAD-1	1,00	0,00	7,81	0,7658
	đối chứng	0,89	0,00	28,33	
Quần thể cuối (cây/mẫu Anh in 1000's)	AAD-1	31,06	27,00	36,00	0,0230
	đối chứng	32,17	27,00	36,00	
Độ ẩm của hạt (%)	AAD-1	22,10	14,32	27,80	0,5132
	đối chứng	21,84	14,52	31,00	
Khối lượng thử nghiệm (lb/gia)	AAD-1	54,94	51,10	56,80	0,4123
	đối chứng	54,66	51,00	56,80	
Hiệu suất (gia/mẫu Anh)	AAD-1	193,50	138,85	229,38	0,9712
	đối chứng	187,05	99,87	256,72	

Thử nghiệm B

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Giá trị trung bình	Khoảng giá trị		Giá trị p
			Tối thiểu	Tối đa	
Chiều cao của cây (inso)	AAD-1	106,92	104,00	108,00	0,0178
	đối chứng	100,79	95,00	104,00	
Chiều cao tai (inso)	AAD-1	51,75	49,00	50,00	0,1552
	đối chứng	45,63	38,00	50,00	
Vị trí tạm thời của cuống (%)	AAD-1	1,24	0,00	15,07	0,1513
	đối chứng	0,72	0,00	22,22	
Vị trí tạm thời của rễ (%)	AAD-1	0,64	0,00	6,15	0,2498
	đối chứng	0,40	0,00	9,09	
Quần thể cuối (cây/mẫu Anh in 1000's)	AAD-1	31,30	26,00	37,00	0,4001
	đối chứng	30,98	25,00	35,00	
độ ẩm của hạt (%)	AAD-1	23,71	14,34	28,70	0,9869
	đối chứng	23,72	13,39	31,10	
Khối lượng thử nghiệm (lb/gia)	AAD-1	56,96	50,90	59,50	0,2796
	đối chứng	56,67	52,00	60,10	
Hiệu suất (gia/mẫu Anh)	AAD-1	200,08	102,32	258,36	0,2031
	đối chứng	205,41	95,35	259,03	

Bảng 25. (đối chứng) Phân tích về các đặc tính nông học

Thử nghiệm C

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Giá trị trung bình	Khoảng giá trị		Giá trị p
			Tối thiểu	Tối đa	
Chiều cao của cây (inso)	AAD-1	95,92	94,00	96,00	0,1262
	đối chứng	90,92	90,00	90,00	
Chiều cao tai (inso)	AAD-1	47,75	41,00	50,00	0,4630
	đối chứng	43,75	37,00	46,00	
Vị trí tạm thời của cuống (%)	AAD-1	6,74	0,00	27,47	0,4964
	đối chứng	5,46	0,00	28,12	
Vị trí tạm thời của rễ (%)	AAD-1	0,3512	0,00	7,58	0,8783
	đối chứng	0,3077	0,00	33,33	
Quần thể cuối (cây/mẫu Anh in 1000's)	AAD-1	32,78	29,00	36,00	0,0543
	đối chứng	31,68	24,00	35,00	
Độ ẩm của hạt (%)	AAD-1	19,09	13,33	25,90	0,5706
	đối chứng	19,36	13,66	26,50	
Khối lượng thử nghiệm (lb/gia)	AAD-1	54,62	42,10	58,80	0,1715
	đối chứng	55,14	52,80	58,40	
Hiệu suất (gia/mẫu Anh)	AAD-1	192,48	135,96	243,89	0,2218
	đối chứng	200,35	129,02	285,58	

Thử nghiệm D

Thông số (đơn vị)	Xử lý	Giá trị trung bình	Khoảng giá trị		Xử lý
			Tối thiểu	Tối đa	
Vị trí tạm thời của cuống (%)	AAD-1	7,29	0,00	9,26	0,4364
	đối chứng	4,17	0,00	39,06	
Quần thể cuối (cây/mẫu Anh in 1000's)	AAD-1	29,93	27,00	34,00	0,0571
	đối chứng	31,86	29,00	35,00	
Độ ẩm của hạt (%)	AAD-1	18,74	19,40	24,40	0,4716
	đối chứng	19,32	13,35	25,70	
Khối lượng thử nghiệm (lb/gia)	AAD-1	56,59	54,80	58,30	0,0992
	đối chứng	55,50	52,70	57,40	
Hiệu suất (gia/mẫu Anh)	AAD-1	203,55	196,51	240,17	0,7370
	đối chứng	199,82	118,56	264,11	

Ví dụ 8. Sử dụng vị trí cài xen biến thể gen ngô DAS-40278-9 cho việc xâm nhập hướng đích

Tính năng nông nghiệp thích hợp của gen chuyển của biến thể gen ngô DAS-40278-9 so với một số thể hệ trong các điều kiện hiện trường đưa ra giả thuyết rằng các vùng đã nhận diện này quanh vị trí cài xen biến thể gen ngô DAS-40278-9 tạo ra các vị trí hệ gen tốt cho việc xâm nhập hướng đích của gen chuyển gen quan tâm khác. Việc xâm nhập

hướng đích này khắc phục các vấn đề với cái gọi là “hiệu ứng vị trí”, và nguy cơ tạo ra đột biến trong hệ gen khi xâm nhập gen chuyển vào vật chủ. ưu điểm nữa của việc xâm nhập hướng đích này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, giảm số lượng lớn các biến thể gen biến nạp phải được sàng lọc và được thử nghiệm trước khi thu được thực vật chuyển gen có mức biểu hiện gen chuyển mong muốn mà không gây ra các bất thường do bởi cài xen không chủ ý của gen chuyển vào một locut quan trọng trong hệ gen vật chủ. Ngoài ra, việc xâm nhập hướng đích này cho phép kết hợp các gen chuyển làm cho quá trình nhân giống các dòng cây loại ưu với cả hai loại gen hiệu quả hơn.

Bằng việc sử dụng phân mô tả được bộc lộ, người có hiểu biết trung bình có thể hướng đích các axit polynucleic quan tâm đến cùng vị trí đoạn cài xen trên nhiễm sắc thể 2 biến thể gen như ở biến thể gen ngô DAS-40278-9 hoặc đến vị trí ở trạng thái gần nhau với vị trí đoạn cài xen ở biến thể gen ngô DAS-40278-9. Một phương pháp như vậy được đề cập trong Công bố đơn patent quốc tế số WO2008/021207, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Tóm lại, lên đến 20Kb trình tự hệ gen nằm ở sườn bên 5' đến vị trí đoạn cài xen và lên đến 20Kb trình tự hệ gen nằm ở sườn bên 3' đến vị trí đoạn cài xen (các vị trí được nhận diện liên quan đến SEQ ID NO:29) được sử dụng để nằm ở sườn bên gen hoặc gen quan tâm được dự định để được cài xen vào vị trí hệ gen trên nhiễm sắc thể 2 qua tái tổ hợp tương đồng. Gen hoặc gen quan tâm có thể được đặt một cách chính xác như trong vị trí cài xen biến thể gen ngô DAS-40278-9 hoặc có thể được đặt ở vị trí bất kỳ trong vùng 20Kb quanh vị trí cài xen biến thể gen ngô DAS-40278-9 để tạo ra mức biểu hiện gen chuyển thích hợp mà không gây tác động bất lợi đến cây. ADN vật truyền chứa gen hoặc gen quan tâm và trình tự nằm ở sườn bên có thể được phân phối vào các tế bào cây qua một trong số các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Việc cài xen vật truyền ADN thể cho vào vị trí đích biến thể gen ngô DAS-40278-9 có thể được tăng cường tiếp bằng một trong số các phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, quá trình đồng biểu hiện hoặc quá trình điều hòa trên sự tái tổ hợp làm tăng cường gen hoặc quá trình điều hòa dưới gen ức chế tái tổ hợp nội sinh. Hơn nữa, đã biết trong lĩnh vực này rằng sự phân cắt sợi kép trình tự đặc hiệu trong hệ gen có thể được sử dụng để làm tăng tần suất tái tổ hợp tương đồng, vì vậy việc cài xen vào vị trí cài xen biến thể gen ngô

DAS-40278-9 và các vùng nằm ở sườn bên của nó có thể được tăng cường bởi sự biểu hiện của endonucleaza đặc hiệu trình tự tự nhiên hoặc được thiết kế để phân cắt khỏi trình tự này. Do vậy, bằng cách sử dụng phần mô tả được đề xuất trong bản mô tả này, axit nucleic dị tương đồng bất kỳ có thể được cài xen trên nhiễm sắc thể ngô 2 ở vị trí đích được định vị giữa gen đánh dấu phân tử 5' được mô tả trong ví dụ 4 và gen đánh dấu phân tử 3' được mô tả trong ví dụ 4, tốt hơn là trong SEQ ID NO:29, và/hoặc các vùng của chúng như được mô tả ở một nơi khác trong bản mô tả này.

Ví dụ 9. Quá trình cắt catxet biểu hiện gen *pat* ra khỏi biến thể gen ngô DAS-40278-9

Loại bỏ catxet biểu hiện gen đánh dấu chọn lọc là có lợi đối với việc cài xen hướng đích vào các locut hệ gen của biến thể gen ngô DAS-40278-9. Loại bỏ gen đánh dấu có thể chọn lọc *pat* ra khỏi biến thể gen ngô DAS-40278-9 cho phép sử dụng lại gen đánh dấu có thể chọn lọc *pat* trong quá trình xâm nhập hướng đích của các axit polynucleic vào nhiễm sắc thể 4 trong các thế hệ ngô tiếp theo.

Bằng cách sử dụng phần mô tả được bộc lộ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể cắt các axit polynucleic quan tâm ra khỏi biến thể gen ngô DAS-40278-9. Một phương pháp như vậy được đề cập trong đơn patent Mỹ số 61/297,628, được kết hợp vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Tóm lại, endonucleaza đặc hiệu trình tự như các nucleaza protein ngón tay kẽm được thiết kế nhận diện, gắn kết và phân cắt trình tự đặc hiệu ADN nằm ở sườn bên catxet biểu hiện gen. Các nucleaza protein ngón tay kẽm được phân phối vào tế bào cây bằng cách lai chéo cây bố mẹ chứa catxet biểu hiện nucleaza protein ngón tay kẽm chuyển gen với cây bố mẹ thứ hai chứa biến thể gen ngô DAS-40278-9. Thế hệ con thu được được phát triển tính thuần thực và được phân tích về việc mất catxet biểu hiện *pat* nhờ phủ lá bằng thuốc diệt cỏ chứa glufosinat. Thế hệ cây con không chống chịu với thuốc diệt cỏ được xác nhận về mặt phân tử và có lợi cho tự thụ tinh. Việc cắt và loại bỏ catxet biểu hiện *pat* đã xác nhận về mặt phân tử ở thế hệ con thu được từ quá trình tự thụ tinh. Bằng cách sử dụng phần mô tả được đề xuất trong bản mô tả này, axit nucleic dị tương đồng bất kỳ có thể được cắt ra khỏi nhiễm sắc thể ngô 2 ở vị trí đích được định vị giữa gen đánh dấu phân tử 5' và gen đánh dấu phân tử 3' như được mô tả trong ví dụ 4, tốt hơn là trong SEQ ID NO:29 hoặc các vùng đã được chỉ ra của chúng.

Ví dụ 10. Tính chống chịu sự gãy giòn (Brittlesnap)

Sự gãy giòn (Brittlesnap) để chỉ sự đứt gãy của cuống ngô do gió to sau khi dùng các thuốc diệt cỏ điều hoà sinh trưởng, thông thường là trong giai đoạn sinh trưởng nhanh. Các thử nghiệm "đẩy" cơ học, sử dụng thanh để đẩy bằng vật lý ngô để mô phỏng hư hại do gió to gây ra, được thực hiện trên ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và cây đối chứng không chứa biến thể gen DAS-40278-9. Các xử lý được hoàn thành ở bốn vị trí địa lý khác nhau và được thực hiện lại bốn lần (có một ngoại trừ đối với một thử nghiệm chỉ thực hiện lại ba lần). Các sơ đồ này gồm tám luống: bốn luống của mỗi thể lai trong số hai thể lai, với hai luống chứa biến thể gen DAS-40278-9 và hai luống không chứa biến thể gen này. Mỗi luống có chiều dài hai mươi feet. Cây ngô được sinh trưởng đến giai đoạn phát triển V4, và thuốc diệt cỏ thương phẩm chứa 2,4-D (Weedar 64, Nufarm Inc., Burr Ridge, IL) được dùng ở các tỷ lệ 1120g ae/ha, 2240g ae/ha và 4480g ae/ha. Bảy ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ, thử nghiệm đẩy cơ học được thực hiện. Thử nghiệm đẩy cơ học về sự gãy giòn (Brittlesnap) gồm bước kéo thanh 4 foot xuống hai luống ngô để mô phỏng hư hại do gió gây ra. Chiều cao của thanh và tốc độ chuyển động được cài đặt để thu được mức đứt gãy cuống thấp (bằng hoặc nhỏ hơn 10%) với cây không được xử lý để đảm bảo thử nghiệm đủ nghiêm ngặt để chứng minh sự khác nhau giữa các xử lý. Tính định hướng của xử lý gãy giòn (Brittlesnap) được áp dụng với ngô bị nghiêng.

Hai trong số các vị trí thử nghiệm được trải qua gió to và giông bão 2-3 ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ 2,4-D. Trong hai ngày liên tiếp, giông bão được bắt đầu ở Huxley IA. Tốc độ gió nằm trong khoảng từ 2 đến 17 m s⁻¹ với tốc độ cao là 33 m s⁻¹ được báo cáo ở vị trí bàn đặc. Hướng gió có thể thay đổi. Trong một ngày, giông bão được báo cáo ở Lanesboro MN. Gió có vận tốc cao được báo cáo ở vị trí bàn đặc này. Ngoài ra, cả hai cơn bão đã tạo ra mưa. Sự kết hợp của mưa và gió gây ra hư hại gãy giòn (Brittlesnap) đã được báo cáo.

Các đánh giá về sự hư hại do gãy giòn (Brittlesnap) thu được từ thử nghiệm đẩy cơ học (và thời tiết khắc nghiệt) được thực hiện nhờ ước tính bằng thị giác tỷ lệ phần trăm hư hại. Trước khi xử lý bằng thanh gây gãy giòn cơ học (Brittlesnap), tiến hành đếm số cuống ngô đối với thể lai ngô chứa biến thể gen DAS-40278-9 và đối chứng. Vài ngày sau khi xử lý bằng thanh gây gãy giòn (Brittlesnap) số lượng cuống của sơ đồ được đánh giá lại. Tỷ lệ phần trăm nghiêng và tỷ lệ phần trăm cuống giảm trong sơ đồ được xác định (bảng 26). Dữ

liệu từ các thử nghiệm này đã chứng minh được rằng ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 có xu hướng gãy giòn ít hơn (Brittlesnap) so với ngô lai không chứa biến thể gen này sau khi dùng 2,4-D.

Bảng 26: Tính chống chịu sự gãy giòn (Brittlesnap) của ngô DAS-40278-9 đối với việc dùng V4 của 2,4-D Amin. Tỷ lệ phần trăm gãy giòn (Brittlesnap) được tính toán đối với cây ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và so với cây đối chứng không chứa biến thể gen này.

Trước khi làm gãy cơ học tỷ lệ % nghiêng trung bình 7-8 ngày sau khi dùng ¹				
Xử lý	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Không chứa biến thể gen (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Không chứa biến thể gen (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120g ae/ha	0%	38%	0%	33%
Weedar 64 2240g ae/ha	1%	42%	0%	33%
Weedar 64 4480g ae/ha	2%	55%	1%	46%
Không được xử lý	0%	0%	0%	0%
Sau khi làm gãy cơ học tỷ lệ % nghiêng trung bình ³ 11-14 ngày sau khi dùng				
Xử lý	278 (SLB01-278//4XP811XTR)	Không chứa biến thể gen (SLB01//4XP811XTR)	278 (SLB01VX-278//BE9515XT)	Không chứa biến thể gen (SLB01VX//BE9515XT)
Weedar 64 1120 g ae/ha	0%	19%	1%	24%
Weedar 64 2240 g ae/ha	4%	20%	7%	27%

Weeda r 64 4480 g ae/ha	4%	26%	6%	28%
Không được xử lý	0%	0%	0%	0%
Sau khi làm gãy cơ học Tỷ lệ % cuống giảm ³ 11-14 ngày sau khi dùng				
Xử lý	278 (SLB01- 278//4XP811 XTR)	Không chứa biến thể gen (SLB01//4XP811XT R)	278 (SLB01VX- 278//BE9515XT)	Không chứa biến thể gen (SLB01VX//BE 9515XT)
Weeda r 64 1120 g ae/ha	3%	38%	6%	42%
Weeda r 64 2240 g ae/ha	9%	35%	12%	41%
Weeda r 64 4480 g ae/ha	9%	40%	16%	40%
Không được xử lý	0%	0%	0%	0%

¹ Giông bão và gió to đã xảy ra 2-3 ngày sau khi dùng trong hai thử nghiệm

² Các xử lý được thực hiện bốn lần trong thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên (một thử nghiệm chỉ được hoàn thành trong ba lần thực hiện)

³ Giá trị trung bình hiệu chỉnh đối với các biến thể gen không được xử lý (Giá trị trung bình không được xử lý được ép đến số không)

Ví dụ 11 - Phân tích protein của hạt

Hạt được tạo ra từ ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 có tổng hàm lượng protein cao hơn so với cây đối chứng không chứa biến thể gen này. Hai thử nghiệm trường nhiều vị trí liên tiếp được tiến hành bao gồm mẫu không được phun và mẫu được phun bằng thuốc diệt cỏ với ba hỗn hợp thuốc diệt cỏ khác nhau. 7 trong số 8 phép so sánh có tính thống kê, biến thể gen DAS-40278-9 tạo ra hạt có tổng hàm lượng protein cao hơn đáng kể (bảng 27). Dữ liệu này được chứng thực bằng các phân tích về các axit amin riêng lẻ.

Bảng 27: Protein hàm lượng của hạt từ các thử nghiệm trường nhiều vị trí

Vụ mùa trên cánh đồng 2008	Không chuyển gen Gần đẳng giá trị	Biến thể gen DAS-40278-9 không được phun	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop	Biến thể gen DAS-40278-9 2,4-D	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop và 2,4-D
Giá trị trung bình	9,97	10,9	11,1	10,5	10,9
% tăng so với đẳng giá trị	0	9,3	11,3	5,3	9,3
Cấp thử nghiệm t	NA	0,002	0,0004	0,061	0,002
Vụ mùa trên cánh đồng 2008	Không chuyển gen Gần đẳng giá trị	Biến thể gen DAS-40278-9 không được phun	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop	Biến thể gen DAS-40278-9 2,4-D	Biến thể gen DAS-40278-9 quizalofop và 2,4-D
Giá trị trung bình	10,9	11,6	11,7	11,7	11,5
% tăng so với đẳng giá trị	0	6,4	7,3	7,2	5,5
Cấp thử nghiệm t	NA	0,0048	0,001	0,0012	0,0079

Ví dụ 12. Thử nghiệm nông học bổ sung

Các đặc tính nông học của ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với ngô gần đẳng giá trị được thu gom từ các thử nghiệm trường nhiều vị trí ở các môi trường địa lý khác nhau cho mùa sinh trưởng. Các dữ liệu này được thu gom và được phân tích về các đặc tính nông học như được mô tả trong ví dụ 7. Các kết quả cho các dòng ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với các cây không chứa biến thể gen được nêu trong bảng 28. Ngoài ra, các đặc tính nông học đối với các dòng ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 và các cây không chứa biến thể gen được phun các thuốc diệt cỏ quizalofop (280g ae/ha) ở giai đoạn phát triển V3 và 2,4-D (2,240g ae/ha) được phun ở giai đoạn phát triển V6 được mô tả trong bảng 29.

Bảng 28: Kết quả về hiệu suất, tỷ lệ phần trăm độ ẩm, và quần thể cuối đối với ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với mẫu đối chứng gần đẳng giá trị.

Tên	Hiệu suất	Độ ẩm của hạt (%)	Quần thể cuối (cây/mẫu Anh được báo cáo trong 1000's)
Ngô lai chứa DAS-40278-9	218,1	21,59	31,69
Ngô lai đối chứng	217,4	21,91	30,42

Bảng 29: Kết quả về hiệu suất, tỷ lệ phần trăm độ ẩm, tỷ lệ phần trăm stock lodging, tỷ lệ phần trăm vị trí tạm thời của rễ và tổng quần thể đối với các dòng ngô lai chứa biến thể gen DAS-40278-9 so với mẫu đối chứng gần đẳng giá trị.

Thử nghiệm	Hiệu suất	Độ ẩm của hạt (%)	Stock Lodge (%)	Root Lodge (%)	Quần thể cuối (cây/mẫu Anh được báo cáo trong 1000's)
Thử nghiệm phun					
Ngô lai #1 chứa DAS-40278-9	214,9	23,4	0,61	2,19	30
Mẫu ngô lai đối chứng #1	177,9	23,46	0,97	36,32	28,36
LSD (0,5)	13,3	1,107	0,89	10,7	1,1
Không phun					
Ngô lai #1 chứa DAS-40278-9	219,6	22,3	0,95	1,78	30,8
Mẫu ngô lai đối chứng #1	220,3	22,51	0,54	1,52	30,55
LSD (0,5)	6,9	0,358	0,98	1,65	0,7
Thử nghiệm phun					
Ngô lai #2 chứa DAS-40278-9	198,6	26,76	0,38	2,08	29,29
Mẫu ngô lai đối chứng #2	172,3	23,76	1,5	39,16	28,86
LSD (0,5)	13,3	1,107	0,89	10,7	1,1
Không phun					
Ngô lai #2 chứa DAS-40278-9	207,8	24,34	0,22	0,59	31
Mẫu ngô lai đối chứng #2	206,2	24,88	0,35	0,12	30,94
LSD (0,5)	8,0	0,645	0,55	1,79	0,9

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây ngô chuyển gen chứa hệ gen, trong đó hệ gen này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:29.
2. Hạt ngô chứa hệ gen bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:29.
3. Cây ngô được tạo ra bằng cách gieo trồng hạt theo điểm 2, trong đó cây ngô này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:29.
4. Cây con của cây ngô theo điểm 3, trong đó cây con này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:29.
5. Cây con có tính chống chịu thuốc diệt cỏ của cây ngô theo điểm 1, trong đó cây con này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:29.
6. Bộ phận của cây ngô theo điểm 3, trong đó bộ phận này được chọn từ nhóm bao gồm phần hoa, noãn, hoa, chồi, rễ và lá, bộ phận này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29.
7. Phương pháp phát hiện biến thể gen ngô AAD-1 DAS-40278-9 trong mẫu chứa ADN ngô, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với:
 - a. đoạn mồi thứ nhất gắn kết với trình tự biên được chọn từ nhóm bao gồm các gốc 1-1873 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc 6690-8557 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29, và các đoạn bổ sung của chúng; và
 - b. đoạn mồi thứ hai gắn kết với trình tự cài xen bao gồm các gốc 1874-6689 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29 hoặc đoạn bổ sung của chúng; đưa mẫu này vào phản ứng chuỗi polymeraza; và thử nghiệm về sản phẩm khuếch đại được tạo ra giữa các đoạn mồi này.
8. Phương pháp phát hiện biến thể gen ngô AAD-1 DAS-40278-9 trong mẫu chứa ADN ngô, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với ít nhất một polynucleotit thích hợp để xác định và phân biệt duy nhất một trình tự polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29, trong đó polynucleotit này bao gồm ít nhất 30 nucleotit

và lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt trong 6X natri clorua/natri xitrat (SSC) ở 45°C, tiếp theo là rửa trong 0,2X SSC ở 50°C, với trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các gốc từ 1863 đến 1875 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc từ 6679 đến 6700 có trình tự được nêu trong SEQ ID NO:29, và các đoạn bổ sung của chúng; trong đó phương pháp này còn bao gồm việc đưa mẫu và polynucleotit này vào điều kiện lai hóa nghiêm ngặt trên; và thử nghiệm mẫu này về sự lai hóa polynucleotit với ADN này.

9. Kit phát hiện ADN:

- a. bao gồm đoạn mỗi thứ nhất và đoạn mỗi thứ hai theo điểm 7; hoặc
- b. bao gồm polynucleotit lai hóa trong điều kiện rửa nghiêm ngặt trong 0,2X SSC ở 50°C với trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các gốc từ 1863 đến 1875 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29, các gốc từ 6679 đến 6700 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29, và các đoạn bổ thể của chúng; và bao gồm chất phản ứng và vật liệu cần thiết để thực hiện việc phát hiện này.

10. Polynucleotit bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29.

11. Phương pháp phòng trừ cỏ dại, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa thuốc diệt cỏ aryloxyalkonat lên vùng có chứa ít nhất một cây trồng, trong đó một cây trồng này là cây trồng theo điểm 1.

12. Cây ngô chuyển gen chứa axit nucleic tái tổ hợp nằm trong hệ gen của cây trồng này, axit nucleic tái tổ hợp này bao gồm axit nucleic chứa các gốc 1874-6689 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 29 được cài xen giữa axit nucleic biên đầu 5' bao gồm các gốc 1-1873 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29 và axit nucleic biên đầu 3' bao gồm các gốc 6690-8557 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:29.

13. Hạt ngô thu được từ cây ngô theo điểm 12.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Dow AgroSciences LLC

<120> Cây ngô chuyển gen, cây con của cây ngô này, hạt ngô chuyển gen, polynucleotit, phương pháp phát hiện biến thể gen ngô, kit phát hiện ADN và phương pháp phòng trừ cỏ dại

<130> DAS-P0167

<160> 33

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 1

tgcactgcag gtcgactcta gaggat

26

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 2

gcggtggcca ctattttcag aag

23

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 3

ttgttacggc atatatccaa tagcgg

26

<210> 4

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 4

ccgtggccta ttttcagaag aagttc

26

<210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 5
 acaaccatat tggctttggc tga

23

<210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 6
 cctgttgta aaataactcaa ttgtcctt

28

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 7
 ctccattcag gagacctcgc ttg

23

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 8
 gtacaggtcg catccgtgta cga

23

<210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 9
 cccccctct ctaccttctc tagat

25

<210> 10
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 10

gtcatgccct caattctctg aca

23

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 11

gtcgcttcag caacacctca gtc

23

<210> 12

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 12

agctcagatc aaagacacac ccc

23

<210> 13

<211> 28

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 13

tcgtttgact aatttttcgt tgatgtac

28

<210> 14

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 14

tctcactttc gtgtcatcgg tcg

23

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400> 15
ccagcacgaa ccattga

17

<210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 16
cgtgtatata aggtccagag ggta

24

<210> 17
<211> 17
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 17
ttgggagaga gggctga

17

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 18
tggttaagtgt ggaaggcatc

20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 19
gaggtacaac cggagcgttt

20

<210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi

<400> 20

ccgacgcttt tctggagta 19

<210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 21
 tgtgccacat aatcacgtaa ca 22

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

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 22
 gagacgtatg cgaaaattcg 20

<210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 23
 ttgcttcagt tcctctatga gc 22

<210> 24
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 24
 tccgtgtcca ctcttttgt 19

<210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 25
 gcaaaggaaa actgccattc tt 22

<210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 26
 tctctaagcg gcccaaactt

20

<210> 27
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 27
 attctggctt tgctgtaaat cgt

23

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi

<400> 28
 ttacaatcaa cagcaccgta cctt

24

<210> 29
 <211> 8557
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự cài xen và sườn bên đối với giống DAS-40278-9

<400> 29
 actggtatatt aatatacttt aataaatatt attagattcc tcgtcaaaga actttttaca
 atatattctat ttagaatcat atatgtcata gttttttttc taagagtcta gtttactagt
 aaaatccgac tcacattttt cgaacttggg atgcaacact taaatagtagt aaaaccttgg
 tatgcagtat ttacatttgt aagattcaaa atttctaaag cagtatatat atgtttccag
 aaacttatag atatagaaaa aacagagaga cgtatgcaa aattcgataa aggtgtacat
 tggattcgca aggtctaaata catattttatc gtggatccat gcagagtttg ggtaataaaaa
 ttagatactt ccaatcatgt gccacataat cacgtaacat tagtaattta aatgacatta
 ccatgtccaa ctgatttaaa acacaaactc ttcttgaacc atatagtttg acaaaccaaa
 tatatataac tggagctact agttatgaat caattaaaaa ttactttgaa gattcaacgt

60

120

180

240

300

360

420

480

540

agtgccagtt tggctctagc acatctaacc agaagggcta aggctggctt caacaggaac	600
agccaaatcc gagatcgagc catttgccat ttttgggtag ttagtttaac tttcatatat	660
cttcccatcc ttttttgcct agcctaaatg gctttgatgt tgaagaccat attaatattgc	720
ttcagtggca ctaggacaac catattggct ttggctgacc cgtagagtt agcctaattg	780
gtggaagggg agggaagggg aggatcgatg gtggcatgag agaggggttg acgatcacga	840
tgatgatgcg agtgaggagg agaggggtggc gacgacacag gggagaaagg agagggacgc	900
taggagcgtc aagggcgtgg gggaggggag ggtcggaggg atgaaggatg acctaaatat	960
tattgttgag tgatagaggg ttattcaact atccgaccgc tcgattttga tggatatgta	1020
aatttgtgtg tcatttgttt gatggattta gtaaaggtta tgggtctaga ggtgattttt	1080
gttgggtggg ttttacagag tttaaactag cggattatat agtggtatag aagatatagt	1140
tttattagaa catctccaaa atgtgactcg aaataatacc cccaaaattt aaaatactac	1200
atcattttga taaaaaagggt aaagtagagc actgttgga cagtttttaa aagttgtgcc	1260
ctatatttta aaatagggta ctgatttaaa atattgttgt gggggataga tatccccggg	1320
tccactagaa ggcgagaagg cctcgcgtgt ggccacgggc cagttacccc gcaaggccat	1380
cccttcgtgg gtcgagctag aattactggt agaatgggct gaccgaagaa ggcaacagac	1440
tcgagcccaa acaatccatc ggctcgtgcg ctatccacag aaactaccgc actttccggc	1500
gcatggcatc ctagaatatc ggggcgtatt agggatgagt cagcgagatt ttcggaagat	1560
tagttcagtt tgttcgctat tatntagtag acatatgac ctcatgtacg tatggagtgc	1620
cccacggtcg tgtatataag gtccagaggg taccatca tttctatcga ccatctacct	1680
atctcatcag cttttctcca ttcaggagac ctgcgttgta acccaccaca tatagatcca	1740
tccaagaag tagtgtatta cgctctcta agcgcccaa acttgagaa aaccgcctat	1800
ccctctctcg tgcgtccagc acgaaccatt gagttacaat caacagcacc gtaccttgaa	1860
gcggaataca atgaaggtta gctacgattt acagcaaagc cagaatacaa tgaaccataa	1920
agtgattgaa gtcgaaata tacgaaggaa caaatatatt taaaaaata cgcaatgact	1980
tggaacaaaa gaaagtgata tttttttgt tcttaacaa gcatcccctc taaagaatgg	2040
cagttttcct ttgcatgtaa ctattatgct cccttcgtta caaaaatttt ggactactat	2100
tgggaaactt ttctgaaaat agtggccacc gcttaattaa ggcgcgcat gcccgggcaa	2160
gcggccgctt aattaaattt aaatgtttta actaggaaat ccaagcttgc atgcctgcag	2220
atccccggg atcctctaga gtgcacctgc agtgcagcgt gaccgggtcg tgccctctc	2280
tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaatt accacatat ttttttgtca	2340
cacttgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata tttaaacttt actctacgaa	2400
taatataatc tatagtacta caataatatc agtgttttag agaatcatat aaatgaacag	2460

ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat tttgacaaca ggactctaca gttttatctt	2520
tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct tcacctatat aatacttcat	2580
ccattttatt agtacatcca tttagggttt aggggttaatg gtttttatag actaatTTTT	2640
ttagtacatc tattttattc tatttttagcc tctaaattaa gaaaactaaa actctatttt	2700
agttttttta tttaatagtt tagatataaa atagaataaa ataaagtgc taaaaattaa	2760
acaaataccc tttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat ttttcttggt tcgagtagat	2820
aatgccagcc tgtaaagcg cgctgcagag tctaacggac accaaccagc gaaccagcag	2880
cgctgcgctc ggccaagcga agcagacggc acggcatctc tgctgctgcc tctggacccc	2940
tctcgagagt tccgctccac cggtggactt gctccgctgt cggcatccag aaattgctg	3000
gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc tcctcctctc acggcaccgg	3060
cagctacggg ggattccttt cccaccgctc ctctgctttc ccttcctcgc ccgccgtaat	3120
aaatagacac cccctccaca ccctctttcc ccaacctcgt gttgttcgga gcgcacacac	3180
acacaaccag atctccccca aatccaccgc toggcacctc cgcttcaagg tacgccgctc	3240
gtcctcccc ccccccccc tctctacctt ctctagatcg gcgttcgggt ccatgcatgg	3300
ttagggcccg gtagttctac ttctgttcat gtttgtgtta gatccgtgtt tgtgttagat	3360
ccgtgctgct agcgttcgta cacggatgcg acctgtacgt cagacacggt ctgattgcta	3420
acttgccagt gtttctcttt ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga	3480
tcgatttcat gatttttttt gtttcgttgc atagggtttg gtttgccctt ttcttttatt	3540
tcaatatatg ccgtgcactt gtttgtcggg tcatcttttc atgctttttt ttgtcttggt	3600
tgtgatgatg tggctctggt gggcggtcgt tctagatcgg agtagaattc tgtttcaaac	3660
tacctggtgg atttattaat ttgggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagttac	3720
gaattgaaga tgatggatgg aaatatcgat ctaggatagg tatacatggt gatgcgggtt	3780
ttactgatgc atatacagag atgctttttg ttcgcttggt tgtgatgatg tgggtgtggt	3840
gggcggtcgt tcattcgttc tagatcggag tagaatactg tttcaaacta cctggtgtat	3900
ttattaattt tggaactgta tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg	3960
gatggaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcatata	4020
catgatggca tatgcagcat ctattcatat gctctaacct tgagtaccta totattataa	4080
taaacaagta tgttttataa ttatttcgat cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag	4140
cagctatatg tggatttttt tagccctgcc ttcatacgtt atttatttgc ttggtactgt	4200
ttcttttgtc gatgctcacc ctggtgtttg gtgttacttc tgcagggtac ccccggtgc	4260
gaccatggct catgctgccc tcagccctct ctcccaacgc tttgagagaa tagctgtcca	4320

gccactcact ggtgtccttg gtgctgagat cactggagtg gacttgaggg aaccacttga 4380
 tgacagcacc tggaatgaga tattggatgc cttccacact taccaagtca tctactttcc 4440
 tggccaagca atcaccaatg agcagcacat tgcattctca agaaggtttg gaccagttga 4500
 tccagtgcct cttctcaaga gcattgaagg ctatccagag gttcagatga tccgcagaga 4560
 agccaatgag tctggaaggg tgattggtga tgactggcac acagactcca ctttccttga 4620
 tgcacctcca gctgctgttg tgatgagggc catagatgtt cctgagcatg gcggagacac 4680
 tgggttcctt tcaatgtaca cagcttggga gaccttgtct ccaacatgc aagccacat 4740
 cgaagggctc aacgttgtgc actctgccac acgtgtgttc ggttccctct accaagcaca 4800
 gaaccgtcgc ttcagcaaca cctcagtcaa ggtgatggat gttgatgctg gtgacagaga 4860
 gacagtccat cccttggttg tgactcatcc tggctctgga aggaaagggc tttatgtgaa 4920
 tcaagtctac tgcagagaa ttgagggcat gacagatgca gaatcaaagc cattgcttca 4980
 gttcctctat gagcatgcca ccagatttga cttcacttgc cgtgtgaggt ggaagaaaga 5040
 ccaagtcctt gtctgggaca acttgtgcac catgcaccgt gctgttcctg actatgctgg 5100
 caagttcaga tacttgactc gcaccacagt tgggtggagt aggcctgccc gctgagtagt 5160
 tagcttaatc acctagagct cgtttaaact gagggcactg aagtcgcttg acgtgctgaa 5220
 ttgtttgtga tgttggtggc gtattttgtt taaataagta agcatggctg tgattttatc 5280
 atatgatcga tctttggggt tttatttaac acattgtaaa atgtgtatct attaataact 5340
 caatgtataa gatgtgttca ttcttcggtt gccatagatc tgcttatttg acctgtgatg 5400
 ttttgactcc aaaaaccaa atcacaaactc aataaactca tggaatatgt ccacctgttt 5460
 cttgaagagt tcatctacca ttccagttgg catttatcag tgttcagcg gcgctgtgct 5520
 ttgtaacata acaattgtta cggcatatat ccaatagcgg ccggcctcct gcagggttta 5580
 aacttgccgt ggctatttt cagaagaagt tcccaatagt agtccaaaat ttttgtaacg 5640
 aaggagcat aatagttaca tgcaaaggaa aactgccatt ctttagaggg gatgcttgtt 5700
 taagaacaaa aaatatatca ctttcttttg ttccaagtca ttgcgtattt ttttaaaaat 5760
 atttgttcct tcgtatatct cgagcttcaa tcactttatg gttctttgta ttctggcttt 5820
 gctgtaaaac gtagctaacc ttcttcctag cagaaattat taatacttg gatatttttt 5880
 tagaatcaag taaattacat attaccacca catcgagctg cttttaaaatt catattacag 5940
 ccatataggg ttgattcatt ttgcaaaatt tccaggatat tgacaacgtt aacttaataa 6000
 tatcttgaaa tattaagct attatgatta ggggtgcaaa tggaccgagt tggttcgggt 6060
 tatatcaaaa tcaaaccaaa ccaactatat cggtttgat tggttcgggt ttgccgggtt 6120
 ttcagcattt tctggttttt tttttgtag atgaatatta ttttaactct actttgtcaa 6180
 atttttgata agtaaatata tgtgttagta aaaattaatt ttttttacia acatatgatc 6240

tattaaaata ttcttatagg agaattttct taataacaca tgatatttat ttatttttagt	6300
cgtttgacta atttttcggt gatgtacact ttcaaagtta accaaattta gtaattaagt	6360
ataaaaatca atatgatacc taaataatga tatgttctat ttaattttta attatcgaaa	6420
tttcacttca aattcgaaaa agatatataa gaattttgat agattttgac atatgaatat	6480
ggaagaacaa agagattgac gcatttttagt aacacttgat aagaaagtga tcgtacaacc	6540
aattatttta agttaataaa aatggagcac ttcatattta acgaaatatt acatgccaga	6600
agagtcgcaa atattttctag atatttttta aagaaaattc tataaaaagt cttaaaggca	6660
tatatataaa aactatatat ttatatTTTT tacccaaaag caccgcaagg ggtagccctg	6720
ggtgtgcgga cggactctaa acaccgacag ctggcgcgcc aggtaggggg tgtgtctttg	6780
atctgagcta gctcaatgac cattacctcc aaatgcaaga tcgcccttcg ccccgggact	6840
atgttttgct ttggaacat ctcatocata gcagatgaag agggaactct gcaccgcata	6900
gcagatctat tggagaagaa gctttcctca gaaatctcga ggggagccag ggcagaacag	6960
cggttgccac catcacccgc acctcaagcg aagatgacct cttacaaacc gaaagtcggg	7020
agctcaccta cccgaaaaac tccgctgtcc acttcgcca caaaggagtg gacacggatt	7080
actcgaaaga aggaagcgag tgtcccgagt caggggacgg gaacacgcca agccatcttt	7140
ccgacgcctt cgccctcaaa tgaggatgga aagaagagcg ccatcgcgct ggctcctttc	7200
taccccgacg tcctcttcat cagggggaga ttggagttag caccgtctt caacgatgag	7260
ccaacatgc aaggggaaga gcctccccag cgtgaggcgc gacgacggag gaatagaagc	7320
cagaacgtgc ggcgacatca cgaggctggg gaacgggatc cggcgcaacc cgtatcccg	7380
gacgaagctt tagaagtagg aaaaactccc gacgagtggg tacaccgaga aaggcggaac	7440
tctcgccgcc gtgatcgccg acaagcttag gaccgagaac gagagcaagc cgagcaaggt	7500
gcaaggctgc gccgagagaa tgctctcttt gctcggaacc tgtacccga cttcgctcgt	7560
gcaatgaaca cgccgagtga agtcggaggg gtactggccc agatagctga cggcctccc	7620
cgaaccctag acacggaagg ctaccggcgg ctgcttactc gagcagttaa tcaccttcta	7680
cccatcacta atcctccaag cgacctacgc catgccatca acagccggcg agacacgcgg	7740
agctccatca acgcttcgcg cgaccgatga cacgaaagtg agatagggaa ccgagaggag	7800
tatgtccgag atcatgccat cctggcatga agtcatgccca cccgagctga gtcggttgcg	7860
gcctcgacca gtgtcccggt ccagggacga tcaagatgac acacaactgg ctcccctcct	7920
tgggaccgac ctacgaacg ccgacatgaa gacacgtcg gagtcttcgc acttactccg	7980
tgtctccggg ccatccagtg gccctaact tcaaggtctc caacgtcagc aagtatgagc	8040
gcaagcagga cctgggtggc tggtagcca tctacacgat tgtcacatgg gccgccggag	8100

cgacggagga cgtgatgaca gtgtattttc ccattgtcct agggcaagac gcaatgcagt 8160
 ggctccgaca tctaccccaa cattgcatag acaattggag cgacttcagt tgggtgcttca 8220
 tcgccaactt ccagtccttc ttgacaagc cggcgcagcc atgggaccta aaatccattg 8280
 ggcacagagg cgatgaaacg ctccggttgt acctcaagag gtttttagacc atgaggaacc 8340
 acacccccga agtcgccgag gcgggggtga ttgaagactt ctaccgagga tccaatgact 8400
 cggttttcgt ccgagccata ctccagaaaa gcgtcggcca cctccgaaca cttgttccgg 8460
 gaggcagacc tctacatcac cacggattaa cggggccagg acctcatcgg aggcacgaaa 8520
 gccgcgccac acgcgccacg gtgtgacacg aaccagc 8557

<210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho gen đánh dấu sườn bên

<400> 30
 gcctagtcgc ctaccctacc aat 23

<210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho gen đánh dấu sườn bên

<400> 31
 tgtgttcttg attgggtgag acat 24

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho gen đánh dấu sườn bên

<400> 32
 tactggggat tagagcagaa g 21

<210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi cho gen đánh dấu sườn bên

<400> 33
 aatctatgtg tgaacagcag c 21

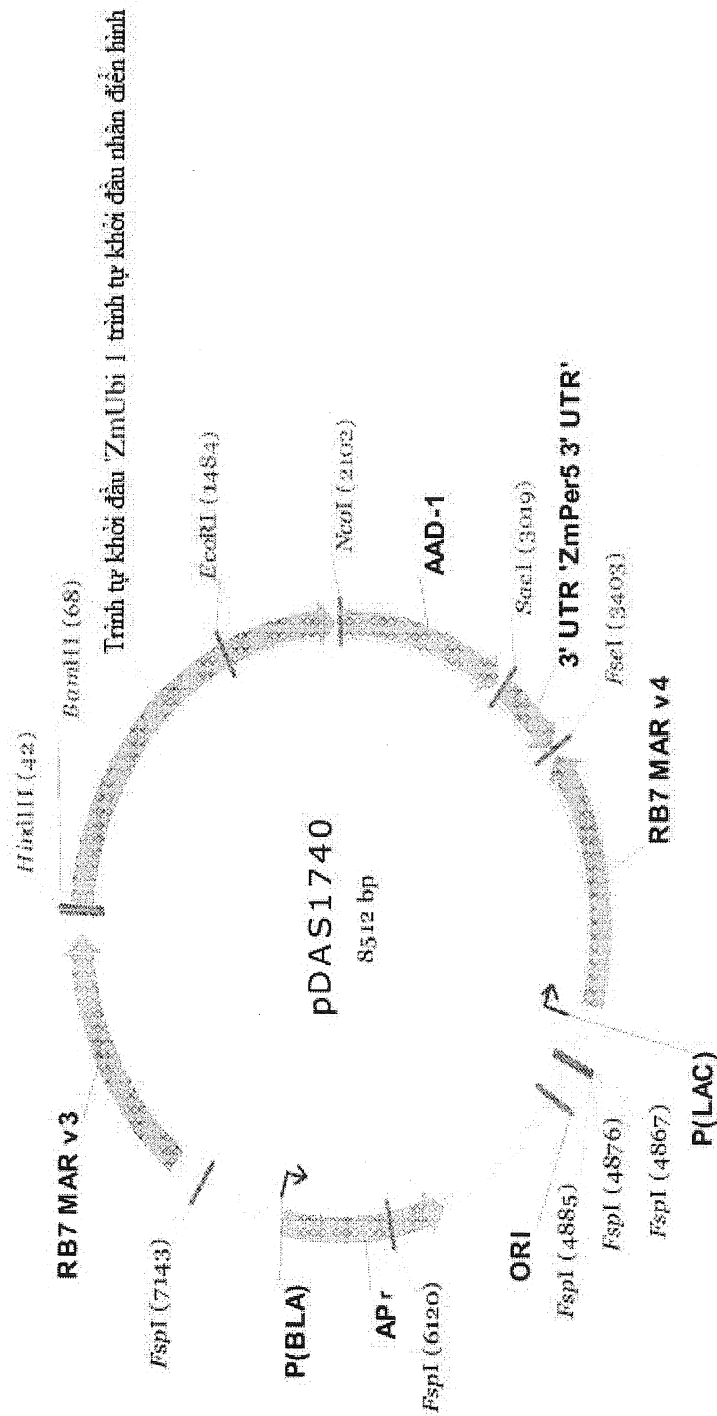


Fig. 1: Bản đồ plasmit của pDAS1740 (pDAB3812) với các vị trí enzym giới hạn



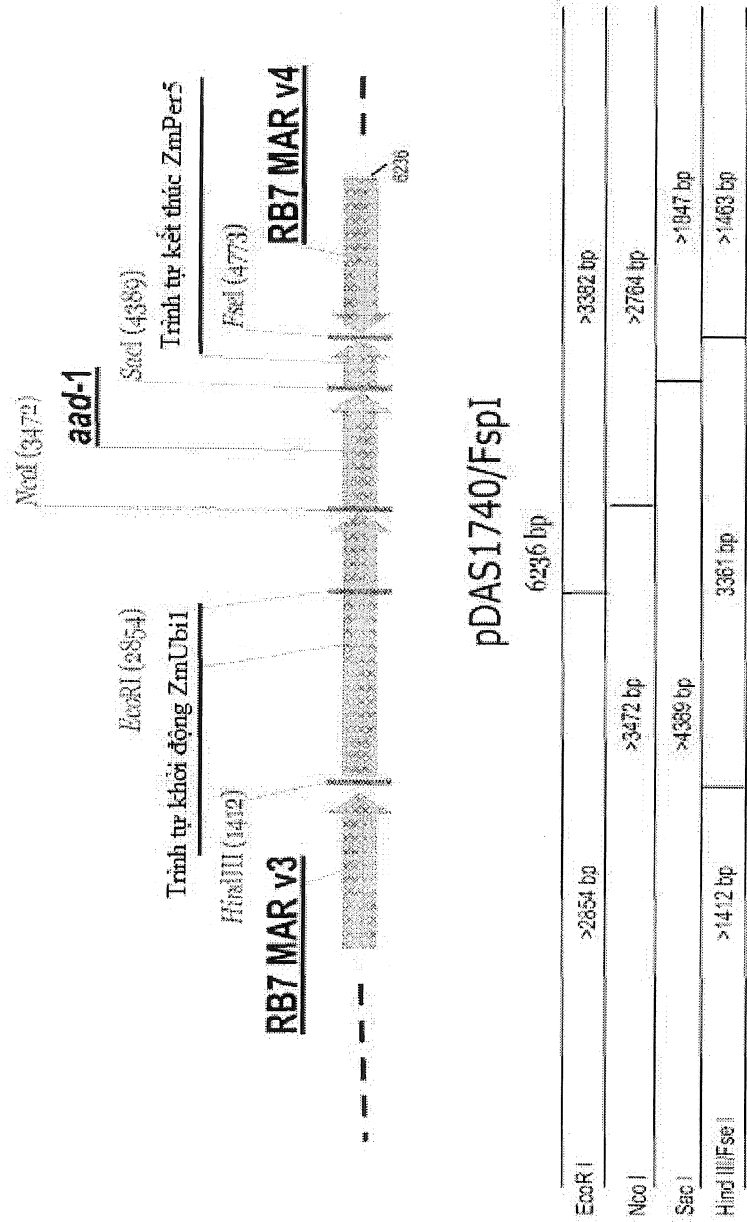


Fig. 3. Bản đồ giới hạn của một vị trí cắt xen trong hệ gen của DAS-40278-9 của ngô

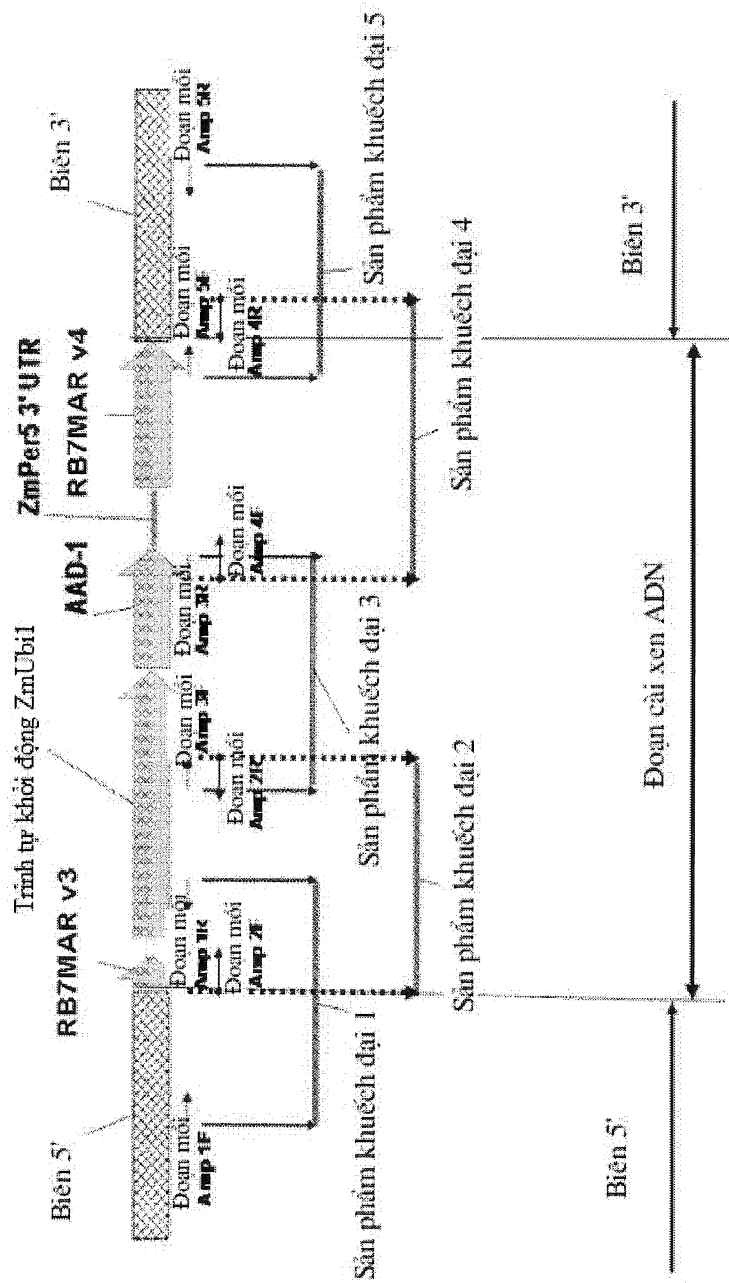


Fig. 4. Sơ đồ tách đồng vô tính đối với đoạn cài xen ADN ở giống ngô
DAS-40278-9

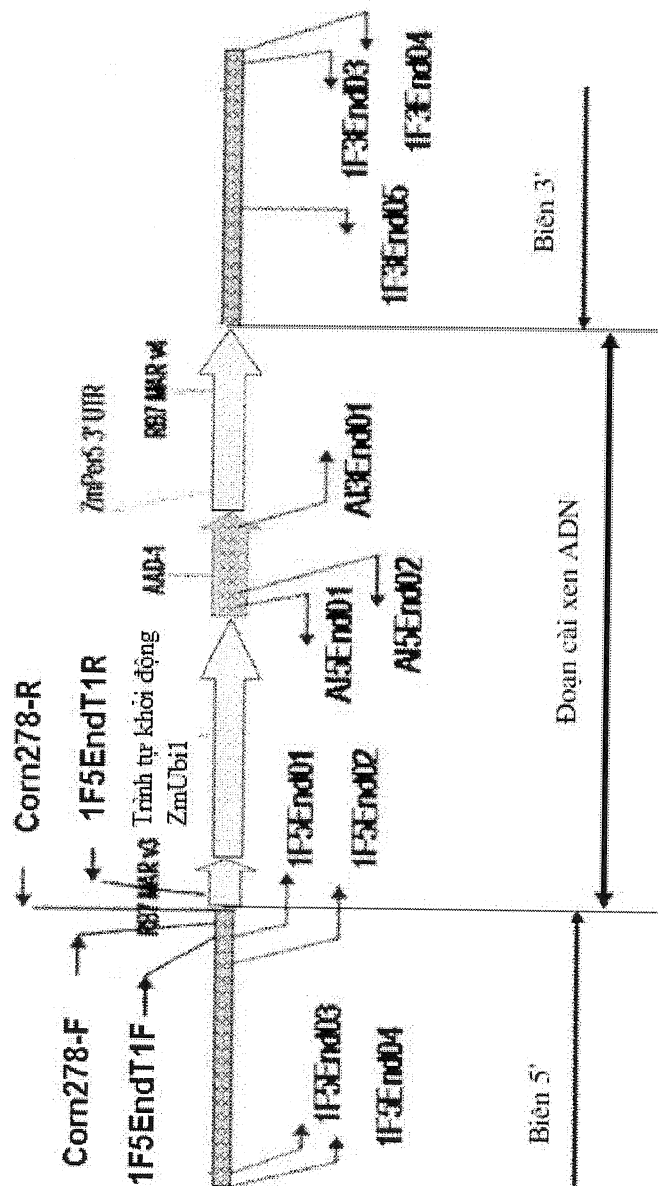


Fig. 5. Sơ đồ về các đoạn nối được sử dụng trong khuếch đại PCR để xác nhận các vùng biên chặn của giống ngô DAS-40278-9. Sơ đồ này cho biết vị trí đoạn nối để xác nhận việc sắp xếp trình tự có chiều dài đầy đủ của giống ngô AAD-1 DAS-40278-9 từ biên 5' đến biên 3'.

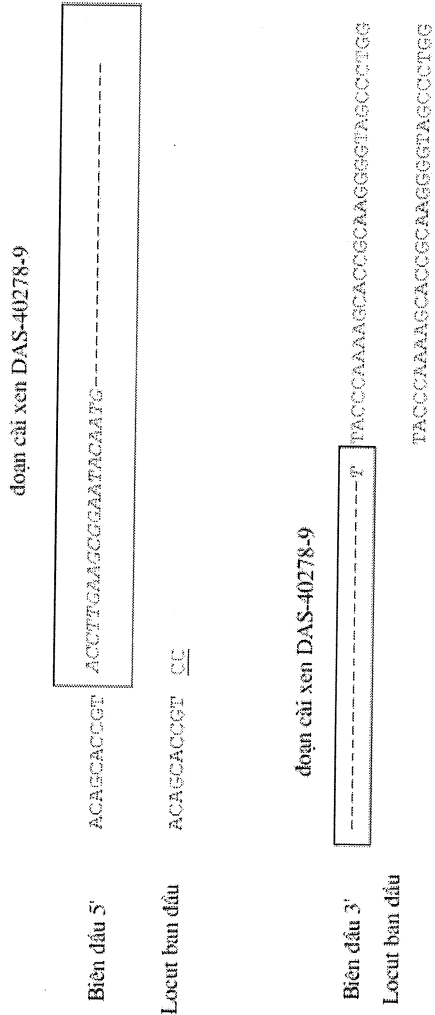


Fig. 6. Cài xen trình tự ADN ở vùng nối của giống ngô DAS-40278-9. Cài xen 21pb (in nghiêng) ở phần nối liên hợp làm khuyết 2bp (phần gạch chân) ở locut hệ gen ban đầu. Hiện tượng cài xen 1bp cũng được tìm thấy ở vùng nối liên hợp 3'

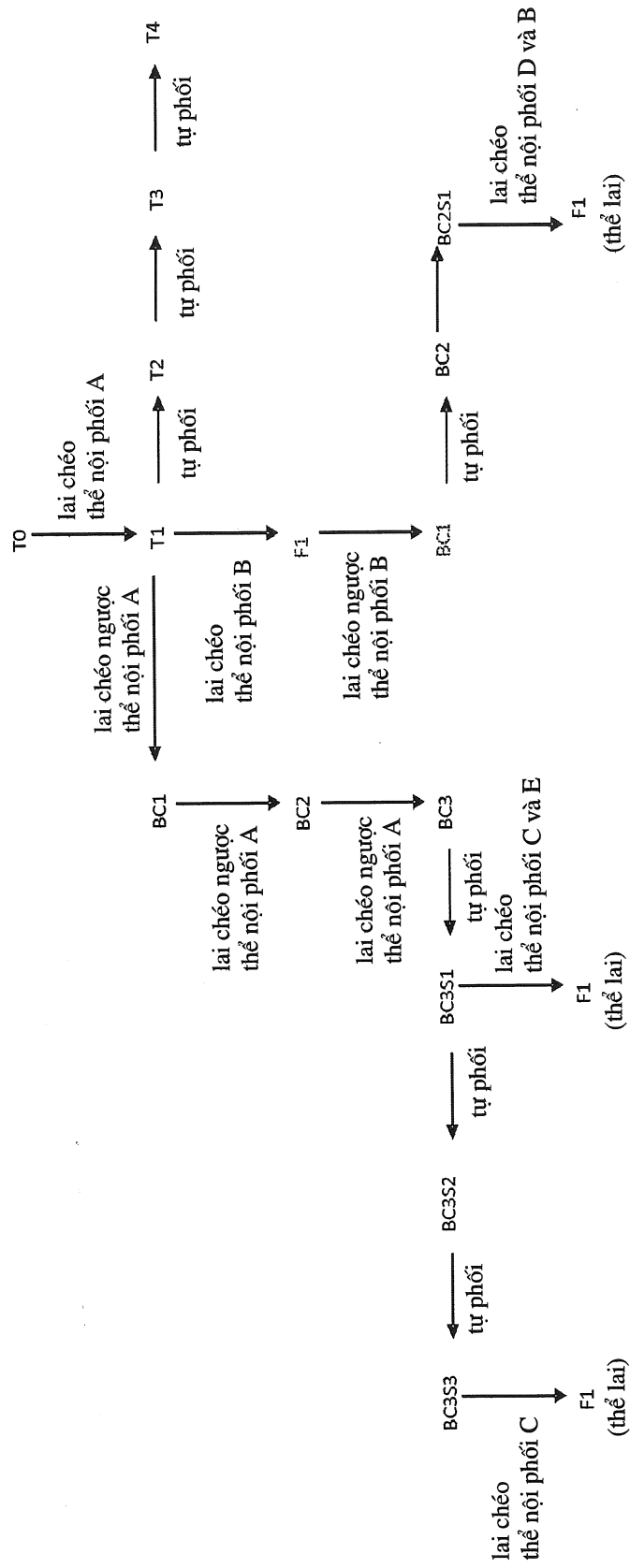


Fig. 7. Sơ đồ nhân giống đối với ngô 40278 và các thể hệ được sử dụng để phân tích