



(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)



1-0027767

(51)⁷ C12Q 1/68; C07H 21/00

(13) B

(21) 1-2012-01793

(22) 23/11/2010

(86) PCT/US2010/057869 23/11/2010

(87) WO/2011/063411 26/05/2011

(30) 09014564.0 23/11/2009 EP; 61/263,690 23/11/2009 US; 61/367,227 23/07/2010 US

(45) 25/03/2021 396

(43) 25/02/2013 299A

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

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

2. MS TECHNOLOGIES LLC (US)

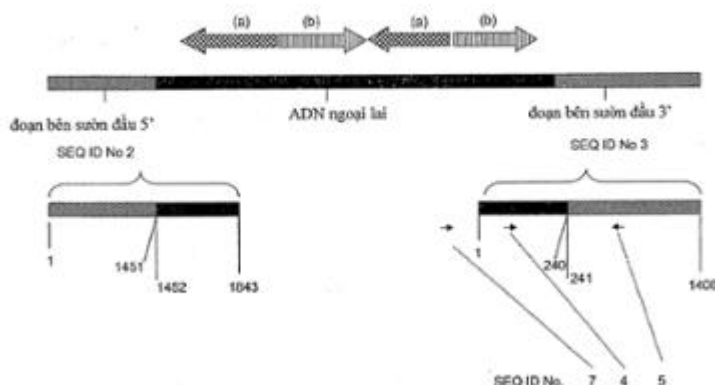
103 Avenue D, West Point, Iowa 52656, United States of America

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

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

(54) CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN MANG SỰ KIẾN ƯU TÚ EE-GM3,
PHƯƠNG PHÁP VÀ KIT ĐỂ XÁC ĐỊNH SỰ KIẾN NÀY TRONG MẪU SINH
HỌC

(57) Sáng chế đề xuất cây đậu tương chuyển gen, vật liệu thực vật và hạt đậu tương chuyển gen, trong đó các sản phẩm này mang sự kiện biến nạp đặc hiệu truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ ở vị trí cụ thể trong hệ gen của đậu tương. Sáng chế còn đề xuất phương pháp, kit và các đoạn mồi đặc hiệu cho phép xác định nhanh và rõ ràng sự kiện này trong mẫu sinh học.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến cây đậu tương chuyển gen, vật liệu thực vật và hạt đậu tương chuyển gen, khác biệt ở chỗ chúng mang sự kiện biến nạp đặc hiệu, đặc biệt là sự có mặt của các gen mã hóa protein mà mang lại khả năng chịu được thuốc diệt cỏ, ở vị trí cụ thể trong hệ gen của đậu tương. Cây đậu tương theo sáng chế kết hợp kiểu hình chịu được thuốc diệt cỏ với năng suất trồng trọt, tính ổn định về mặt di truyền và chức năng trên các nền tảng di truyền khác nhau tương đương với giống đậu tương không được biến nạp khi không có (các) thuốc diệt cỏ. Sáng chế còn đề xuất phương pháp và kit để xác định sự có mặt của vật liệu thực vật mang sự kiện biến nạp đặc hiệu EE-GM3 trong các mẫu sinh học.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Việc xác định rõ sự kiện ưu tú ngày càng trở nên quan trọng theo các thảo luận về thực phẩm/thức ăn mới, sự phân biệt các sản phẩm biến đổi gen và các sản phẩm không biến đổi gen và việc xác định vật liệu độc quyền. Lý tưởng, nếu phương pháp xác định đó vừa nhanh và vừa đơn giản, không cần đến trang thiết bị thử nghiệm phức tạp và đắt tiền. Hơn thế nữa, phương pháp này cần đưa ra kết quả cho phép xác định rõ ràng sự kiện ưu tú mà không cần đến sự giải thích của chuyên gia, nhưng vẫn là các kết quả chính xác dưới sự kiểm soát của chuyên gia, nếu cần. Các công cụ chuyên biệt

để sử dụng nhằm xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học được nêu theo sáng chế.

Theo sáng chế, EE-GM3 được xác định là sự kiện ưu tú trong quần thể các cây đậu tương biến đổi gen trong quá trình phát triển đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ (*Glycine max*) mang gen mã hóa khả năng chịu được glyphosat kết hợp với gen chịu được các chất ức chế 4-hydroxy phenylpyruvat dioxygenaza (HPPD), mỗi gen được kiểm soát bởi một trình tự khởi đầu có thể biểu hiện được ở thực vật.

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

Trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rằng không hề dễ dàng có được sự kiện chuyển gen ưu tú chịu được thuốc diệt cỏ ở quy mô thương mại ở cây đậu tương với năng suất trồng trọt chấp nhận được, mà không làm giảm sản lượng, và có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ đáng kể, chắc chắn đối với 2 nhóm thuốc diệt cỏ khác nhau.

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

Cây đậu tương Optimum GAT(TM) cũng đã được tạo ra kết hợp khả năng chịu được glyphosat với khả năng chịu các thuốc diệt cỏ ALS, nhưng đã có thông báo rằng giống đậu tương này không đáp ứng được tiêu chuẩn chịu được glyphosat (mà không kết hợp với sự kiện đậu tương chịu được glyphosat khác như sự kiện 40-3-2 (ví dụ, xem www.bloomberg.com/apps/news?pid=newsaixhive&sid=ad4L0hH9MKWE)).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất cây đậu tương chuyển gen, hoặc hạt, tế bào hoặc mô của nó, chứa catxet biểu hiện đã được hợp nhất một cách ổn định vào hệ gen của nó mà mang gen chịu được thuốc diệt cỏ chứa trình tự mã hóa gen *2mEPSPS* và gen chịu được thuốc diệt cỏ khác chứa trình tự mã hóa HPPD-Pf W336 (cả hai đều được bộc lộ trong Ví dụ 1.1 theo sáng chế và được nêu trong SEQ ID NO. 1), chịu được glyphosat và chất diệt cỏ ức chế HPPD như isoxaflutol, và có năng suất trồng trọt, khi không có (các) thuốc diệt cỏ, hầu như tương đương với dòng đồng gen không chuyển gen. Sau

khi dùng một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ mà cây này có khả năng chịu được, thì nó sẽ có kiểu hình nông học tốt hơn so với cây không biến đổi gen.

Cây đậu tương theo sáng chế hoặc hạt, tế bào hoặc mô của nó mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất cây đậu tương chuyển gen, hạt, tế bào hoặc mô của nó, ADN hệ gen của nó khác biệt ở chỗ, khi được phân tích theo quy trình xác định bằng PCR như được nêu trong bản mô tả này, bằng cách sử dụng hai đoạn mỗi lần lượt hướng đến vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của EE-GM3 và ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ, thì tạo ra đoạn đặc hiệu với EE-GM3. Các đoạn mỗi này có thể được hướng lần lượt đến vùng bên sườn đầu 5' của SEQ ID NO. 2 và ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ. Các đoạn mỗi này cũng có thể được hướng lần lượt đến vùng bên sườn đầu 3' của SEQ ID NO. 3 và ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ, như các đoạn mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 5 và SEQ ID NO. 4 hoặc SEQ ID NO. 7, và tạo ra đoạn ADN dài khoảng từ 100 đến 800 cặp bazơ, như đoạn gồm khoảng 263 cặp bazơ hoặc khoảng 706 cặp bazơ.

Hạt tham chiếu mang sự kiện ưu tú theo sáng chế đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659. Theo một phương án, sáng chế đề xuất hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu với số nộp lưu NCIMB 41659, mà sẽ phát triển thành cây đậu tương chịu được các thuốc diệt cỏ, đặc biệt là chịu được glyphosat và/hoặc các chất ức chế HPPD như isoxaflutol. Hạt có số nộp lưu ở NCIMB là NCIMB 41659, là mẻ hạt chứa ít nhất là 95% hạt chuyển gen đồng hợp tử đối với ADN được chuyển, mang sự kiện ưu tú theo sáng chế, mà sẽ phát triển thành các cây chịu được thuốc diệt cỏ, nhờ đó các cây này chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol. Hạt hoặc hạt giống con có thể thu được hoặc thu được từ hạt đã được gửi lưu (ví dụ, sau khi lai chéo với các cây đậu tương khác có nền tảng di truyền khác) có thể được gieo và các cây non có thể được xử lý bằng glyphosat hoặc isoxaflutol theo sáng chế để thu được cây hoàn toàn chịu được glyphosat hoặc isoxaflutol (ở mức độ 100%), mang sự kiện ưu tú theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất tế bào, mô, cây con, và các thế hệ tiếp theo của cây mang sự kiện ưu tú theo sáng chế phát triển từ hạt đã được nộp lưu tại NCIMB có số nộp lưu NCIMB 41659. Sáng chế còn đề xuất cây có thể thu được từ (như bằng cách nhân giống và/hoặc gây giống với) cây đậu tương mang sự

kiện ưu tú theo sáng chế (như cây phát triển từ hạt đã được nộp lưu tại NCIMB có số nộp lưu NCIMB 41659). Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định cây biến đổi gen, hoặc tế bào hoặc mô của nó, mang sự kiện ưu tú EE-GM3, phương pháp này dựa trên việc xác định sự có mặt của các trình tự ADN đặc trưng hoặc các axit amin được mã hóa bởi các trình tự ADN này trong cây, tế bào hoặc mô chuyển gen. Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, các trình tự ADN đặc trưng này là các trình tự gồm 15 cặp bazơ hoặc ít nhất là 15 cặp bazơ, tốt hơn là 20 cặp bazơ hoặc ít nhất là 20 cặp bazơ, tốt hơn nữa là 30 cặp bazơ hoặc nhiều hơn mà chứa vị trí cài xen sự kiện này, tức là cả một phần của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ được cài xen vào và một phần của hệ gen đậu tương (vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3') liền kề với nó, cho phép xác định đặc hiệu sự kiện ưu tú này. Sáng chế còn đề xuất cây mang sự kiện EE-GM3 như được xác định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học, trong đó các phương pháp này dựa trên cơ sở các đoạn môi hoặc các mẫu dò mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự bên sườn đầu 5' và/hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp bao gồm bước khuếch đại trình tự của axit nucleic có mặt trong các mẫu sinh học, bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza với ít nhất hai đoạn môi, một trong hai đoạn môi này nhận biết vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, đoạn còn lại nhận biết trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ, tốt hơn là để thu được đoạn ADN dài khoảng từ 100 đến 800 cặp bazơ. Các đoạn môi có thể nhận biết trình tự nằm trong vùng bên sườn đầu 5' của EE-GM3 (SEQ ID NO. 2, từ vị trí 1 đến vị trí 1451) hoặc nằm trong vùng bên sườn đầu 3' của EE-GM3 (phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ vị trí 241 đến vị trí 1408) và trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ (phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ vị trí 1452 đến 1843 hoặc SEQ ID NO. 3 từ vị trí 1 đến vị trí 240), tương ứng. Đoạn môi nhận biết vùng bên sườn đầu 3' có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 5 và đoạn môi nhận biết trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc SEQ

ID NO. 7 theo sáng chế. Sáng chế còn đề xuất các đoạn môi đặc hiệu và ADN đặc hiệu đã được khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn môi này, như được nêu trong bản mô tả này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại trình tự của axit nucleic có mặt trong mẫu sinh học, bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza với hai đoạn môi mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5, để thu được đoạn ADN có khoảng 263 cặp bazơ, hoặc với hai đoạn môi mỗi lần lượt chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 5 và SEQ ID NO. 7, để thu được đoạn ADN có khoảng 706 cặp bazơ. Các cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 được xác định theo cách đó cũng được đề xuất theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất trình tự bên sườn đặc hiệu của EE-GM3 theo sáng chế, mà có thể được sử dụng để phát triển các phương pháp xác định đặc hiệu đối với EE-GM3 trong các mẫu sinh học. Các trình tự bên sườn đặc hiệu này còn có thể được sử dụng làm vật liệu đối chứng tham chiếu trong các thử nghiệm xác định. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất vùng bên sườn đầu 5' và/hoặc 3' của EE-GM3 mà có thể được sử dụng để phát triển các đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này. Vật liệu tham chiếu thích hợp còn là các phân tử axit nucleic, tốt hơn là các phân tử có khoảng từ 150 đến 850 cặp bazơ, chứa trình tự mà có thể được khuếch đại bởi các đoạn môi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 7 và SEQ ID NO. 5 hoặc SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định sự có mặt của sự kiện EE-GM3 trong các mẫu sinh học trên cơ sở sử dụng các đoạn môi hoặc các mẫu dò đặc hiệu này. Các đoạn môi có thể chứa, bao gồm hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit có từ 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, kết hợp với các đoạn môi chứa, gồm, hoặc chủ yếu gồm trình tự nucleotit có từ 17 đến khoảng 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2, như trình tự nucleotit có từ 17 đến 200 nucleotit liên tiếp được chọn từ phần bổ sung cho trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ

ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240. Các đoạn mỗi còn có thể chứa các trình tự nucleotit này nằm ở đầu 3' của chúng, và còn chứa các trình tự không liên quan hoặc các trình tự thu được từ các trình tự nucleotit nêu trên, nhưng chứa bất cặp nhảm.

Sáng chế còn đề xuất kit để xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học, kit này chứa ít nhất một đoạn mỗi hoặc mẫu dò mà nhận biết một cách đặc hiệu vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3.

Ngoài đoạn mỗi mà nhận biết một cách đặc hiệu vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của EE-GM3, kit theo sáng chế có thể chứa đoạn mỗi thứ hai nhận biết một cách đặc hiệu trình tự nằm trong ADN ngoại lai mang các gen EE-GM3 truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ, để sử dụng trong quy trình xác định bằng PCR. Kit theo sáng chế này có thể chứa ít nhất hai đoạn mỗi đặc hiệu, một đoạn mỗi nhận biết trình tự nằm trong vùng bên sườn đầu 5' của EE-GM3, và đoạn mỗi còn lại nhận biết trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ. Đoạn mỗi nhận biết vùng bên sườn đầu 3' có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 5 và đoạn mỗi nhận biết các gen chuyển hoặc ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ có thể chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 hoặc SEQ ID NO. 7, hoặc đoạn mỗi bất kỳ khác hoặc tổ hợp đoạn mỗi bất kỳ khác như được nêu trong bản mô tả này.

Sáng chế còn đề xuất kit để xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học, kit này chứa các đoạn mỗi PCR chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 5 và SEQ ID NO. 4 để sử dụng trong quy trình xác định EE-GM3 bằng PCR theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất kit để xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học, trong đó kit này chứa mẫu dò đặc hiệu chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự mà tương ứng với (hoặc bổ sung với) trình tự có mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với vùng đặc hiệu của EE-GM3. Tốt hơn, nếu trình tự của mẫu dò tương ứng với vùng đặc hiệu chứa một phần của vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của EE-GM3. Tốt nhất, nếu mẫu dò đặc hiệu chứa hoặc (chủ yếu) gồm (hoặc bổ sung với) trình tự có mức độ đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nằm giữa nucleotit từ 1431 đến 1472 của SEQ ID NO. 2 hoặc trình tự có mức đồng

nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% với trình tự nằm giữa nucleotit từ 220 đến 260 của SEQ ID NO. 3.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất trình tự ADN chứa vị trí cài xen sự kiện này và polynucleotit đủ dài của cả ADN hệ gen của đậu tương và ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ (gen chuyển), sao cho có thể sử dụng làm đoạn mồi hoặc mẫu dò để phát hiện EE-GM3, và để xác định đặc tính của các cây mang sự kiện EE-GM3. Các trình tự này có thể chứa ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đậu tương và số lượng nucleotit tương tự của ADN ngoại lai mang các gen truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ của EE-GM3, lần lượt ở mỗi bên của điểm nối. Tốt nhất, nếu các trình tự ADN này chứa ít nhất là 9 nucleotit của ADN hệ gen của đậu tương và số lượng nucleotit tương tự của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ liền kề với vị trí cài xen trong SEQ ID NO. 2 hoặc SEQ ID NO. 3. Theo một phương án, sáng chế đề xuất các cây đậu tương chứa các trình tự ADN đặc hiệu này.

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

Sáng chế còn đề xuất vùng bên sườn đầu 5' và/hoặc 3' của EE-GM3 cũng như các đoạn mồi và mẫu dò đặc hiệu được phát triển từ các trình tự bên sườn đầu 5' và/hoặc 3' của EE-GM3.

Sáng chế còn đề xuất ADN hệ gen thu được từ các cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3. ADN hệ gen này có thể được sử dụng làm vật liệu đối chứng tham chiếu trong các thử nghiệm xác định theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ, hoặc tế bào, bộ phận, hạt hoặc cây con của nó, mỗi đối tượng chứa ít nhất một sự kiện ưu tú, sự kiện ưu tú này chứa ADN ngoại lai chứa:

i) gen khả thứ nhất mà mang gen *epsps* đã được biến đổi từ *Zea mays* mã hóa enzym EPSPS chịu được glyphosat dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu biểu hiện được ở thực vật, và

ii) gen khả thứ hai mà mang gen *hppd* đã được biến đổi từ *Pseudomonas fluorescens* mã hóa enzym chịu được chất diệt cỏ ức chế HPPD dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu biểu hiện được ở thực vật.

Theo một phương án, sự kiện ưu tú này chứa các nucleotit từ 1 đến 1451 của SEQ ID NO. 2 ngay trước và liền kề với ADN ngoại lai nêu trên và các nucleotit từ 241 đến 1408 của SEQ ID NO. 3 ngay sau và liền kề với ADN ngoại lai nêu trên.

Theo phương án khác, sự kiện ưu tú này có thể thu được bằng cách nhân giống với cây đậu tương phát triển từ hạt tham chiếu mang sự kiện này đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

Theo phương án khác, ADN hệ gen của cây đậu tương nêu trên, hoặc tế bào, bộ phận, hạt hoặc cây con của nó khi được phân tích bằng cách áp dụng quy trình xác định sự kiện ưu tú cho sự kiện ưu tú này với hai đoạn mỗi chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5 tương ứng, tạo ra đoạn ADN có (khoảng) 263 cặp bazơ.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định cây đậu tương chuyển gen, hoặc tế bào, bộ phận, hạt hoặc cây con của nó chịu được glyphosat và/hoặc chất diệt cỏ ức chế HPPD, như isoxaflutole, trong các mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm bước khuếch đại đoạn ADN dài khoảng từ 100 đến 500 cặp bazơ từ axit nucleic có mặt trong các mẫu sinh học bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza sử dụng ít nhất hai đoạn mỗi, một trong số các đoạn mỗi này nhận biết vùng bên sườn đầu 5' của sự kiện ưu tú nêu trên, vùng bên sườn đầu 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, hoặc vùng bên sườn đầu 3' của sự kiện ưu tú này, vùng bên sườn đầu 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận biết trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa trình tự nucleotit của

phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240.

Sáng chế còn đề xuất kit để xác định cây đậu tương biến đổi gen, hoặc tế bào, bộ phận, hạt hoặc cây non của nó chịu được glyphosat và/hoặc chất diệt cỏ ức chế HPPD, như isoxaflutol, trong các mẫu sinh học, kit này chứa một đoạn môi nhận biết vùng bên sườn đầu 5' của sự kiện ưu tú nêu trên, vùng bên sườn đầu 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451, hoặc một đoạn môi nhận biết vùng bên sườn đầu 3' của sự kiện ưu tú này, vùng bên sườn đầu 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 3408, và một đoạn môi nhận biết trình tự nằm trong ADN ngoại lai, ADN ngoại lai này chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240.

Theo một phương án của sáng chế, ADN ngoại lai của sự kiện ưu tú EE-GM3, được sử dụng theo sáng chế, chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc chứa trình tự có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95, 98, 99, hoặc 99,5% với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương, tế bào thực vật, mô, hoặc hạt, mà hệ gen của nó chứa phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 97, 98, hoặc ít nhất là 99% với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 97, 98, hoặc ít nhất là 99% với SEQ ID NO. 11 hoặc phần bổ sung của nó.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất cây đậu tương, tế bào thực vật, mô, hoặc hạt, chứa trong hệ gen của nó phân tử axit nucleic lai với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc lai với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc lai với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 hoặc phần bổ sung của nó.

Sáng chế còn đề xuất phân tử axit nucleic phân lập được chứa trình tự nucleotit có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 99% với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 99% với SEQ ID NO. 11 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc phân tử axit nucleic phân lập được chứa trình tự nucleotit lai với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc lai với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 hoặc phần bổ sung của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

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

Hình 1 là sơ đồ thể hiện mối tương quan giữa các trình tự nucleotit được trích dẫn và các đoạn môi, đường nằm ngang màu đen: ADN ngoại lai; đường nằm ngang gạch chéo: ADN có nguồn gốc thực vật; mũi tên nền caro (a): gen mã hóa HPPD Pf W366 khảm (xem Bảng 1 về thành phần của gen khảm); mũi tên nền gạch chéo (b): gen mã hóa 2mEPSPS khảm (xem Bảng 1 về thành phần của gen khảm); mũi tên màu đen: các đoạn môi oligonucleotit, các hình vẽ nằm dưới các đường nằm ngang thể hiện các vị trí nucleotit; (c) biểu thị phần bổ sung của trình tự nucleotit được thể hiện; Lưu ý: sơ đồ này không được thể hiện đúng tỷ lệ.

Hình 2: là ảnh chụp thể hiện các kết quả thu được theo quy trình xác định bằng PCR được phát triển đối với EE-GM3. Tải trình tự lên gel: Đường 1: Chất đánh dấu phân tử lượng (thang 100 cặp bazơ); các đường 2 và 3: các mẫu ADN từ cây đậu tương mang sự kiện chuyển gen EE-GM3; các đường từ 4 đến 7: các mẫu ADN từ các cây đậu tương chuyển gen không mang sự kiện ưu tú EE-GM3, nhưng chứa cùng các gen chịu được thuốc diệt cỏ (các sự kiện biến nạp khác); đường 8: mẫu ADN từ cây đậu tương kiểu hoang; đường 9: đối chứng ADN không có khuôn; đường 10: chất đánh dấu phân tử lượng.

Hình 3: là ảnh chụp thể hiện kết quả thu được theo quy trình PCR đánh giá trạng thái tiếp hợp giao tử được phát triển cho EE-GM3. Tải trình tự lên gel: Đường 1: Chất đánh dấu phân tử lượng (thang 100 cặp bazơ); đường 2 và đường 5: các mẫu ADN từ

cây đậu tương mang sự kiện chuyển gen EE-GM3 ở dạng đồng hợp tử; đường 3, đường 8 và đường 9: các mẫu ADN từ cây đậu tương mang sự kiện chuyển gen EE-GM3 ở dạng dị hợp tử; đường 4, đường 6 và đường 7: mẫu ADN đối chứng từ cây đậu tương đơn; đường 10: đối chứng ADN không có khuôn; đường 11: chất đánh dấu phân tử lượng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sự kết hợp phân tử ADN tái tổ hợp vào hệ gen của thực vật thường xảy ra do sự biến nạp tế bào hoặc mô. Vị trí kết hợp cụ thể thường là vị trí gắn ngẫu nhiên.

ADN được đưa vào hệ gen thực vật do sự biến nạp tế bào hoặc mô thực vật với ADN tái tổ hợp hay "ADN gây biến nạp", và bắt nguồn từ ADN gây biến nạp đó dưới đây được gọi là "ADN ngoại lai" chứa một hoặc nhiều "gen chuyển". Các gen chuyển của EE-GM3 là các gen chịu được glyphosat và thuốc diệt cỏ ức chế HPPD. Thuật ngữ "ADN thực vật" theo sáng chế chỉ ADN có nguồn gốc thực vật mà được biến nạp. ADN thực vật thường được tìm thấy ở cùng một locus di truyền ở thực vật kiểu hoang tương ứng. ADN ngoại lai có thể được đặc trưng bởi vị trí và cấu hình ở nơi kết hợp phân tử ADN tái tổ hợp trong hệ gen của thực vật này. Vị trí trong hệ gen của thực vật này nơi mà ADN tái tổ hợp được cài xen vào còn được gọi là "vị trí cài xen" hay "vị trí đích". Việc cài xen ADN tái tổ hợp vào vùng hệ gen thực vật được gọi là "cài xen sớm ADN thực vật" có thể kèm theo sự xóa bỏ ADN thực vật, được gọi là "xóa bỏ vị trí đích". Các thuật ngữ "vùng bên sườn" hay "trình tự bên sườn" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ trình tự gồm ít nhất là 20 cặp bazơ, tốt hơn là ít nhất 50 cặp bazơ, và đến 5000 cặp bazơ của ADN khác với ADN đã được đưa vào, tốt hơn là ADN từ hệ gen thực vật mà nằm ngay trước và liền kề với, hoặc ngay sau và liền kề với, ADN ngoại lai. Quy trình biến nạp dẫn đến hiện tượng gắn ngẫu nhiên ADN ngoại lai sẽ tạo ra các thể biến nạp với các vùng bên sườn khác nhau, mà chúng khác biệt và đặc trưng cho mỗi thể biến nạp. Khi ADN tái tổ hợp được đưa vào thực vật bằng cách lai chéo thông thường, thì vị trí cài xen của nó trong hệ gen của thực vật này, hoặc các vùng bên sườn của nó thường không thay đổi.

Thuật ngữ "(trình tự) axit nucleic phân lập được" hay "(trình tự) ADN phân lập được" được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ (trình tự) axit nucleic hoặc ADN không còn ở trong môi trường tự nhiên mà từ đó nó được phân lập, ví dụ, trình tự axit

nucleic trong vật chủ vi khuẩn khác hoặc ở hệ gen thực vật, hoặc axit nucleic hoặc ADN đã dung hợp với ADN hoặc axit nucleic từ nguồn khác, như khi ở trong gen khảm dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu biểu hiện được ở thực vật.

Sự kiện được định nghĩa là locus di truyền (nhân tạo) mà, là kết quả của kỹ thuật di truyền, mang ADN ngoại lai hoặc gen chuyển chứa ít nhất một bản sao của gen đáng quan tâm hoặc của các gen đáng quan tâm. Trạng thái alen thông thường của sự kiện là sự có mặt hoặc không có mặt của ADN ngoại lai. Sự kiện được đặc trưng về mặt kiểu hình bởi sự biểu hiện của gen chuyển. Ở mức độ di truyền, sự kiện là một phần của kiểu gen đặc trưng của thực vật. Ở mức độ phân tử, sự kiện có thể được đặc trưng bởi bản đồ cắt giới hạn (ví dụ, như được xác định bằng phương pháp thấm tách Southern), bởi các trình tự bên sườn trước và/hoặc sau gen chuyển, vị trí của các chất đánh dấu phân tử và/hoặc cấu hình phân tử của gen chuyển. Thông thường, việc biến nạp thực vật bằng ADN gây biến nạp chứa ít nhất một gen đáng quan tâm tạo ra quần thể biến nạp chứa nhiều sự kiện đặc trưng riêng lẻ. Sự kiện được đặc trưng bởi ADN ngoại lai và ít nhất một trong số các trình tự bên sườn.

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

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

b) sự kiện khác biệt bởi cấu hình phân tử đã được xác định rõ mà được kế thừa một cách ổn định và có thể phát triển công cụ thích hợp để kiểm soát việc nhận dạng nó;

c) (các) gen đáng quan tâm thể hiện sự biểu hiện kiểu hình chính xác, thích hợp và ổn định về mặt không gian và thời gian, ở cả trạng thái dị hợp tử (hoặc bán hợp tử) và trạng thái đồng hợp tử của sự kiện này, ở mức độ chấp nhận được về mặt thương

mại trong điều kiện môi trường mà thực vật mang sự kiện này sẽ được tiếp xúc khi sử dụng trong nông học thông thường.

Tốt hơn là, ADN ngoại lai được kết hợp với một vị trí trong hệ gen của thực vật này cho phép dễ dàng đưa gen này vào nền tảng di truyền thương mại mong đợi.

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

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

Công cụ được phát triển để xác định sự kiện ưu tú hoặc thực vật hoặc vật liệu thực vật mang sự kiện ưu tú, hoặc các sản phẩm mà chứa vật liệu thực vật mang sự kiện ưu tú này, là dựa trên các đặc tính hệ gen đặc hiệu sự kiện gen ưu tú, như bản đồ cắt giới hạn đặc hiệu của vùng hệ gen chứa ADN ngoại lai, các chất đánh dấu phân tử hoặc trình tự của (các) vùng bên sườn của ADN ngoại lai.

Sau khi một hoặc cả hai vùng bên sườn của ADN ngoại lai được xác định trình tự, các đoạn mồi và các mẫu dò có thể được phát triển mà nhận dạng đặc hiệu (các) trình tự này trong axit nucleic (ADN hoặc ARN) của mẫu bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Ví dụ, phương pháp PCR có thể được phát triển để xác định sự kiện ưu tú trong các mẫu sinh học (như các mẫu từ thực vật, vật liệu thực vật hoặc các sản phẩm chứa vật liệu thực vật). Kỹ thuật PCR này là dựa trên ít nhất hai "đoạn mồi" đặc hiệu, một đoạn mồi nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của sự kiện ưu tú và đoạn mồi kia nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai. Tốt hơn, nếu các đoạn mồi có trình tự có từ 15 đến 35 nucleotit mà trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa lần lượt "nhận dạng một cách đặc hiệu" trình tự nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của sự kiện ưu tú và ADN ngoại lai của sự kiện ưu tú, sao cho một đoạn cụ thể ("đoạn gắn" hoặc đơn vị siêu sao chép phân biệt) được khuếch đại từ mẫu axit nucleic mang sự kiện ưu tú này. Điều đó có nghĩa là chỉ duy nhất đoạn gắn được hướng đích, và không trình tự nào khác trong hệ gen của thực vật này hoặc ADN ngoại lai, được khuếch đại trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa.

Các đoạn mồi PCR thích hợp theo sáng chế có thể là:

- các oligonucleotit có chiều dài từ 17 nucleotit đến khoảng 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề, tốt hơn là 20 nucleotit liền kề, được chọn từ ADN thực vật trong trình tự bên sườn đầu 5' (SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451) ở đầu 3' của chúng (các đoạn mồi nhận dạng các trình tự bên sườn đầu 5'); hoặc

- các oligonucleotit có chiều dài từ 17 nucleotit đến khoảng 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề, tốt hơn là 20 nucleotit liền kề, được chọn từ ADN thực vật trong trình tự bên sườn đầu 3' (phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408) ở đầu 3' của chúng (các đoạn mồi nhận dạng các trình tự bên sườn đầu 3'); hoặc

- các oligonucleotit có chiều dài từ 17 nucleotit đến khoảng 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề, tốt hơn là 20 nucleotit liền kề, được chọn trong số các trình tự ADN đã được cài xen vào (phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843) ở đầu 3' của chúng (các đoạn mồi nhận dạng ADN ngoại lai); hoặc

- các oligonucleotit có chiều dài từ 17 nucleotit đến khoảng 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề, tốt hơn là 20 nucleotit liền kề, được chọn trong số các trình tự ADN đã được cài xen vào (SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240); hoặc

- các oligonucleotit thích hợp có chiều dài từ 17 nucleotit đến khoảng 200 nucleotit, chứa trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề, tốt hơn là 20 nucleotit liền kề, được chọn từ trình tự nucleotit của đoạn ADN đã được cài xen hoặc phần bổ sung của nó (SEQ ID NO. 1 hoặc SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến 16638).

Tất nhiên, các đoạn mồi có thể dài hơn 17 nucleotit liền kề nêu trên, và có thể, ví dụ, dài 20, 21, 30, 35, 50, 75, 100, 150, 200 nucleotit hoặc thậm chí dài hơn nữa. Các đoạn mồi có thể chứa hoàn toàn trình tự nucleotit được chọn trong số các trình tự nucleotit nêu trên của các trình tự bên sườn và các trình tự ADN ngoại lai. Tuy nhiên, trình tự nucleotit của các đoạn mồi ở đầu 5' của chúng (tức là, bên ngoài 17 nucleotit liền kề nằm ở đầu 3') là kém quan trọng hơn. Do đó, trình tự đầu 5' của các đoạn mồi

có thể chứa hoặc bao gồm trình tự nucleotit được chọn trong số các trình tự bên sườn hoặc ADN ngoại lai, nếu thích hợp, nhưng vẫn có thể chứa vài (ví dụ, 1, 2, 5, hoặc 10) bất cặp nhằm. Trình tự đầu 5' của các đoạn môi thậm chí có thể hoàn toàn là trình tự nucleotit không liên quan đến các trình tự bên sườn hoặc ADN ngoại lai, ví dụ, trình tự nucleotit thể hiện một hoặc nhiều vị trí nhận dạng enzym cắt giới hạn. Tốt hơn, nếu các trình tự không liên quan này hoặc các trình tự ADN bên sườn có các bất cặp nhằm không dài hơn 100, tốt hơn nữa là không dài hơn 50 hoặc thậm chí 25 nucleotit.

Hơn thế nữa, các đoạn môi thích hợp có thể chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit ở đầu 3' của chúng kéo dài vùng nối giữa các trình tự thu được từ ADN thực vật và trình tự ADN ngoại lai (nằm ở các nucleotit từ 1451 đến 1452 trong SEQ ID NO. 2 và các nucleotit từ 240 đến 241 trong SEQ ID NO. 3) với điều kiện 17 nucleotit liền kề nằm ở đầu 3' nêu trên không hoàn toàn chỉ có nguồn gốc từ ADN ngoại lai hoặc từ các trình tự có nguồn gốc thực vật trong SEQ ID NO. 2 hoặc SEQ ID NO. 3.

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

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

Các ví dụ về các đoạn môi thích hợp là các trình tự oligonucleotit nêu trong SEQ ID NO. 5 (đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn đầu 3'), SEQ ID NO. 4 (đoạn môi nhận dạng ADN ngoại lai để sử dụng với các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn đầu 3'), hoặc SEQ ID NO. 7 (đoạn môi nhận dạng ADN ngoại lai để sử dụng với các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn đầu 3').

Các ví dụ khác về các đoạn môi oligonucleotit thích hợp chứa các trình tự sau hoặc (chủ yếu) gồm các trình tự này ở đầu 3' của chúng:

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

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 264 đến nucleotit 283

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 266 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1240 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 265 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 265 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1239 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1241 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1244 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1248 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1250 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 262 đến nucleotit 279
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 263 đến nucleotit 279
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 264 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 266 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1238 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1242 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1243 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1245 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1247 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1249 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1249 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 263 đến nucleotit 285
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 267 đến nucleotit 283
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1242 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1243 đến nucleotit 1259
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1246 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1246 đến nucleotit 1263

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1248 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1250 đến nucleotit 1271
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1250 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1241 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1245 đến nucleotit 1267
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1247 đến nucleotit 1269
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1247 đến nucleotit 1263
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1249 đến nucleotit 1271
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1242 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1241 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1243 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1240 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1244 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1239 đến nucleotit 1261
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1245 đến nucleotit 1261

b. Các đoạn mỗi nhận dạng trình tự ADN ngoại lai để sử dụng với các đoạn mỗi nhận dạng trình tự bên sườn đầu 5':

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1751
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1735 đến nucleotit 1754
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1750
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1750
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1752

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1749
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1749
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1751
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1735 đến nucleotit 1751
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1752
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1732 đến nucleotit 1754
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1747
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1731 đến nucleotit 1753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1746
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1745
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1747

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1744
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1727 đến nucleotit 1749
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1745
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1744
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1746
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1747
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1726 đến nucleotit 1748
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1724 đến nucleotit 1744
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1724 đến nucleotit 1745
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1724 đến nucleotit 1746
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1461 đến nucleotit 1478
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1686
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1486

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1508 đến nucleotit 1527
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1686
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1687
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1689
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1704
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1705
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1709
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1486
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1497
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1498
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1507
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1508
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1690

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1691
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1706
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1707
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1708
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1487
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1499
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1505
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1506
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1507
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1508
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1666 đến nucleotit 1686
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1687
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1689

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1707

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1709

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1710

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1500

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1509

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1689

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1690

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1691

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1705

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1706

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1710

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1488

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1507

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1510

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1512
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1513
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1514
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1692
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1694
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1695
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1696
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1703
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1704
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1711
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1488
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1506
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1511
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1690

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1697
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1709
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1487
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1508
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1511
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1491 đến nucleotit 1512
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1666 đến nucleotit 1687
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1672 đến nucleotit 1692
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1693
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1707
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1490
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1491
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1501

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1509
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1495 đến nucleotit 1515
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1691
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1673 đến nucleotit 1694
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1698
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1489
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1667 đến nucleotit 1689
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1708
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1688 đến nucleotit 1710
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1711
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1492
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1510
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1666 đến nucleotit 1688
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1687 đến nucleotit 1709

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1712
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1488
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1490
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1509
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1489 đến nucleotit 1511
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1699
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1493
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1472 đến nucleotit 1494
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1502
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1670 đến nucleotit 1692
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1469 đến nucleotit 1491
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1488 đến nucleotit 1510
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1712
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1713

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1692 đến nucleotit 1714

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1467 đến nucleotit 1489

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1678 đến nucleotit 1700

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1481 đến nucleotit 1503

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1691 đến nucleotit 1713

c. Các đoạn môi nhận dạng trình tự bên sườn đầu 3':

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 847

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 849

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 846

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 848

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 848

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 850

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 845

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 847

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 849

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 851
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 844
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 846
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 828 đến nucleotit 850
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 830 đến nucleotit 852
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 992 đến nucleotit 1009
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 731 đến nucleotit 752
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 795
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 731 đến nucleotit 753
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 794
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 796
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 793
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 797
- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 792

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 776 đến nucleotit 798

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 752

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 753

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 754

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 733 đến nucleotit 755

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 838 đến nucleotit 854

- phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 246 đến nucleotit 263

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

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

d. Các đoạn mỗi nhận dạng trình tự ADN ngoại lai để sử dụng với các đoạn mỗi nhận dạng trình tự bên sườn đầu 3':

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 173 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 22 đến nucleotit 41

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 172 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 174 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 191 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 171 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 175 đến nucleotit 192

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 190 đến nucleotit 210

- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 192 đến nucleotit 210
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 176 đến nucleotit 192
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 189 đến nucleotit 210
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 193 đến nucleotit 210
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 188 đến nucleotit 210
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 194 đến nucleotit 210
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 199 đến nucleotit 218
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 200 đến nucleotit 218
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 197 đến nucleotit 218
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 201 đến nucleotit 218
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 201 đến nucleotit 220
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 200 đến nucleotit 220
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 199 đến nucleotit 220
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 200 đến nucleotit 221
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 199 đến nucleotit 221
- trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 150 đến nucleotit 172

Thuật ngữ "trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. Z từ vị trí X đến vị trí Y" theo sáng chế biểu thị trình tự nucleotit kể cả hai nucleotit đầu mút.

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

Việc phát hiện các đoạn gắn có thể được thực hiện theo một vài cách, ví dụ, bằng cách ước lượng kích thước sau phân tích gel. Các đoạn gắn còn có thể được xác định

trình tự một cách trực tiếp. Các phương pháp đặc hiệu trình tự khác để phát hiện các đoạn ADN đã được khuếch đại cũng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Vì trình tự của các đoạn môi và vị trí tương quan của chúng trong hệ gen là đặc trưng đối với sự kiện ưu tú, bước khuếch đại đoạn gán sẽ chỉ được thực hiện trong các mẫu sinh học chứa (axit nucleic của) sự kiện ưu tú. Tốt hơn, nếu khi thực hiện PCR để xác định sự có mặt của EE-GM3 trong mẫu chưa biết, thì đối chứng được đưa vào bộ đoạn môi mà một đoạn trong "gen quản gia" của loài thực vật mang sự kiện này có thể được khuếch đại với nó. Gen quản gia là gen được biểu hiện trong hầu hết các loại tế bào mà liên quan đến các hoạt tính chuyển hóa cơ bản chung đối với mọi loại tế bào. Tốt hơn, nếu đoạn đã được khuếch đại từ gen quản gia là đoạn lớn hơn đoạn gán đã được khuếch đại. Tùy theo mẫu cần được phân tích, đối chứng khác cho thể được đưa vào.

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

Theo cách khác, các đoạn môi đặc hiệu có thể được sử dụng để khuếch đại đoạn gán có thể được sử dụng làm "mẫu dò đặc hiệu" để xác định EE-GM3 trong các mẫu sinh học. Cho axit nucleic của mẫu sinh học tiếp xúc với mẫu dò này trong các điều kiện cho phép lai mẫu dò này với đoạn tương ứng của nó trong axit nucleic này, tạo ra thể lai axit nucleic/mẫu dò. Sự tạo ra thể lai này có thể được phát hiện (ví dụ, bằng cách đánh dấu axit nucleic này hoặc mẫu dò), bằng cách đó sự tạo thành thể lai biểu thị sự có mặt của EE-GM3. Các phương pháp xác định trên cơ sở lai với mẫu dò đặc

hiệu (trên chất mang pha rắn hoặc trong dung dịch) đó đã được bộc lộ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn, nếu mẫu dò đặc hiệu là trình tự mà lai một cách đặc hiệu, trong các điều kiện đã được tối ưu hóa, với vùng nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của sự kiện ưu tú và tốt hơn còn chứa một phần của ADN ngoại lai tiếp giáp nó (dưới đây được gọi là "vùng đặc hiệu"). Tốt hơn, nếu mẫu dò đặc hiệu chứa trình tự có 50 đến 500 cặp bazơ, tốt hơn là có 100 đến 350 cặp bazơ mà có mức độ đồng nhất ít nhất là 80%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 80 đến 85%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 85 đến 90%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 90 đến 95%, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 95% đến 100% (hoặc bổ sung) với trình tự nucleotit của vùng đặc hiệu. Tốt hơn, nếu mẫu dò đặc hiệu chứa trình tự nằm trong khoảng từ 15 đến 100 nucleotit liên kề nhau đồng nhất với (hoặc bổ sung của) vùng đặc hiệu của sự kiện ưu tú.

Các oligonucleotit thích hợp làm các đoạn mồi PCR để phát hiện sự kiện ưu tú EE-GM3 còn có thể được sử dụng để phát triển quy trình trên cơ sở PCR để xác định trạng thái tiếp hợp giao tử của các thực vật mang sự kiện ưu tú. Để đạt được mục đích này, hai đoạn mồi nhận dạng locus kiểu hoang trước khi gắn được tạo ra theo cách sao cho chúng được hướng đến nhau và có vị trí cài xen nằm ở giữa các đoạn mồi này. Các đoạn mồi này có thể là các đoạn mồi nhận dạng một cách đặc hiệu các trình tự bên sườn đầu 5' và các trình tự bên sườn đầu 3' lần lượt của SEQ ID NO. 2 hoặc SEQ ID NO.3. Các đoạn mồi này cũng có thể là các đoạn mồi nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự bên sườn đầu 5' hoặc trình tự bên sườn đầu 3'. Theo sáng chế, các đoạn mồi đặc biệt thích hợp nhận dạng locus kiểu hoang trước khi gắn là các đoạn mồi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 6. Bộ đoạn mồi này, cùng với đoạn mồi thứ ba bổ sung cho các trình tự ADN biến nạp (như đoạn mồi chứa hoặc (chủ yếu) gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 7) cho phép thực hiện bước khuếch đại theo PCR chẩn đoán đồng thời đối với locus đặc hiệu đối với EE-GM3, cũng như đối với locus kiểu hoang. Nếu thực vật này là đồng hợp tử đối với locus chuyển gen hoặc locus kiểu hoang tương ứng, thì PCR chẩn đoán sẽ tạo ra một sản phẩm PCR điển hình, tốt hơn là điển hình về chiều dài, cho locus chuyển gen hoặc locus kiểu hoang. Nếu thực vật này là dị hợp tử đối với locus chuyển gen, thì sẽ xuất hiện hai sản phẩm PCR đặc hiệu theo locus, phản ánh sự khuếch đại của cả locus chuyển gen và locus kiểu hoang.

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

Thuật ngữ "kit" theo sáng chế chỉ một bộ chất phản ứng nhằm mục đích thực hiện phương pháp theo sáng chế, cụ thể hơn là việc xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học hoặc việc xác định trạng thái tiếp hợp giao tử của vật liệu thực vật mang EE-GM3. Cụ thể hơn, theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất kit chứa ít nhất một hoặc hai đoạn mồi đặc hiệu, như nêu trên để nhận dạng sự kiện ưu tú, hoặc ba đoạn mồi đặc hiệu để xác định trạng thái tiếp hợp giao tử. Tùy ý, kit này còn có thể chứa chất phản ứng bất kỳ khác theo sáng chế trong quy trình xác định bằng PCR. Theo cách khác, theo phương án khác của sáng chế, kit này có thể chứa mẫu dò đặc hiệu, như nêu trên, lai một cách đặc hiệu với axit nucleic của các mẫu sinh học để xác định sự có mặt của EE-GM3 trong mẫu đó. Tùy ý, kit này còn có thể chứa chất

phản ứng bất kỳ khác (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, đệm lai, chất đánh dấu) để nhận dạng EE-GM3 trong các mẫu sinh học, bằng cách sử dụng mẫu dò đặc hiệu.

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

Thuật ngữ "mức độ đồng nhất trình tự" theo sáng chế liên quan đến các trình tự nucleotit (ADN hoặc ARN) nhằm chỉ số lượng vị trí nucleotit đồng nhất chia cho số lượng nucleotit của trình tự ngắn hơn trong số hai trình tự này. Việc bắt cặp trình tự giữa hai trình tự nucleotit được thực hiện theo thuật toán của Wilbur và Lipmann (Wilbur and Lipmann, 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:726) sử dụng cỡ cửa sổ 20 nucleotit, chiều dài từ 4 nucleotit, và điểm trừ khoảng cách 4. Phân tích và dịch nghĩa dữ liệu trình tự có sự trợ giúp của máy tính, kể cả việc bắt cặp trình tự như nêu trên, có thể được thực hiện một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách áp dụng gói phần mềm phân tích trình tự của Genetics Computer Group (GCG, University of Wisconsin Biotechnology Center). Các trình tự được thể hiện là "gần như tương đồng" khi các trình tự này có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất khoảng 75%, đặc biệt ít nhất là khoảng 80%, cụ thể hơn ít nhất là khoảng 85%, cụ thể hơn nữa ít nhất là khoảng 90%, đặc biệt hơn ít nhất là 95%, đặc biệt hơn nữa ít nhất là khoảng 98%, hoặc ít nhất là khoảng 99%. Rõ ràng rằng khi các trình tự ARN được cho là gần như tương đồng hoặc có mức độ đồng nhất về trình tự ở mức độ nhất định với các trình tự ADN, thì thymidin (T) trong trình tự ADN được xem là tương đương với uraxil (U) trong trình tự ARN. Cũng rõ ràng rằng, các khác biệt hoặc đột biến nhỏ có thể xuất hiện trong các trình tự ADN theo thời gian và có thể cho phép một số bắt cặp nhầm mà có thể được phép đối với các đoạn môi hoặc các mẫu dò đặc hiệu sự kiện theo sáng chế, nên trình tự ADN bất kỳ nêu theo phương án bất kỳ của sáng chế đối với ADN bên sườn ở đầu 3' hoặc 5' bất kỳ hoặc đối với đoạn cài xen hoặc ADN ngoại lai bất kỳ hoặc đoạn môi hoặc mẫu dò bất kỳ theo sáng chế, còn bao gồm các trình tự về gần như tương đồng với các trình tự theo sáng chế, như các trình tự lai với, hoặc có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc ít nhất là 99% với trình tự đã nêu đối

với ADN bên sườn ở đầu 3' hoặc 5' bất kỳ, đối với đoạn môi hoặc mẫu dò bất kỳ hoặc đối với đoạn cài xen hoặc ADN ngoại lai bất kỳ theo sáng chế.

Thuật ngữ "đoạn môi" được sử dụng theo sáng chế để chỉ axit nucleic bất kỳ mà có khả năng môi quy trình tổng hợp axit nucleic mới trong quy trình phụ thuộc khuôn, như PCR. Thông thường, các đoạn môi là các oligonucleotit có từ 10 đến 30 nucleotit, nhưng các trình tự dài hơn cũng có thể được sử dụng. Các đoạn môi có thể ở dạng sợi đôi, mặc dù dạng sợi đơn được ưu tiên hơn.

Các mẫu dò có thể được sử dụng làm các đoạn môi, nhưng chúng được thiết kế để liên kết với ADN hoặc ARN đích và không cần được sử dụng trong quy trình khuếch đại.

Thuật ngữ "nhận dạng" theo sáng chế liên quan đến các đoạn môi đặc hiệu để chỉ sự lai một cách đặc hiệu các đoạn môi đặc hiệu này với trình tự axit nucleic ở sự kiện ưu tú trong các điều kiện thiết lập trong phương pháp này (như các điều kiện của quy trình xác định bằng PCR), bằng cách đó xác định được tính đặc hiệu theo sự có mặt của các đối chứng dương và âm.

Thuật ngữ "lai" theo sáng chế liên quan đến các mẫu dò đặc hiệu chỉ sự liên kết giữa mẫu dò với một vùng đặc hiệu trong trình tự axit nucleic của sự kiện ưu tú trong các điều kiện chuẩn nghiêm ngặt. Thuật ngữ các điều kiện chuẩn nghiêm ngặt chuẩn theo sáng chế chỉ các điều kiện lai theo sáng chế hoặc các điều kiện lai thông thường như đã được bộc lộ bởi Sambrook et al, 1989 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY), mà ví dụ có thể bao gồm các bước sau: 1) cố định các đoạn ADN hệ gen thực vật trên màng lọc, 2) lai sơ bộ màng lọc này trong thời gian từ 1 đến 2 giờ ở 42°C trong 50% formamit, 5 X SSPE, 2 X chất phản ứng Denhardt và 0,1% SDS, hoặc trong thời gian từ 1 đến 2 giờ ở 68°C trong 6 X SSC, 2 X chất phản ứng Denhardt và 0,1% SDS, 3) bổ sung mẫu dò lai đã được đánh dấu vào, 4) ủ trong thời gian 16 đến 24 giờ, 5) rửa màng lọc trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng trong 1X SSC, 0,1% SDS, 6) rửa màng lọc ba lần trong 20 phút, mỗi lần ở 68°C trong 0,2 X SSC, 0,1% SDS, và 7) cho màng lọc này tiếp xúc trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ với màng tia X ở -70°C cùng với màng tăng cường.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” theo sáng chế chỉ mẫu thực vật, vật liệu thực vật hoặc các sản phẩm chứa vật liệu thực vật. Thuật ngữ “thực vật” theo sáng chế chỉ mô của cây đậu tương (*Glycine max*), ở giai đoạn phát triển bất kỳ, cũng như tế bào, mô hoặc cơ quan bất kỳ lấy từ hoặc thu được từ cây bất kỳ như vậy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt, lá, thân, hoa, rễ, tế bào đơn, giao tử, dịch nuôi cấy tế bào, dịch nuôi cấy mô hoặc thể nguyên sinh bất kỳ. Thuật ngữ “vật liệu thực vật” theo sáng chế chỉ vật liệu nhận được hoặc thu được từ thực vật. Các sản phẩm chứa vật liệu thực vật đề cập đến thực phẩm, thức ăn chăn nuôi hoặc các sản phẩm khác được tạo ra bằng cách sử dụng vật liệu thực vật hoặc có thể bị nhiễm vật liệu thực vật. Cần phải hiểu rằng, trong phạm vi của sáng chế, các mẫu sinh học này được thử nghiệm về sự có mặt của các axit nucleic đặc hiệu với EE-GM3, ám chỉ sự có mặt của axit nucleic trong các mẫu đó. Do đó, phương pháp được đề cập đến theo sáng chế để xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học, đề cập đến việc nhận dạng các axit nucleic trong các mẫu sinh học mang sự kiện ưu tú này.

Thuật ngữ “chứa” theo sáng chế chỉ sự có mặt của dấu hiệu, số nguyên, bước, chất phản ứng hoặc thành phần được đề cập đến, nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc bổ sung của một hoặc nhiều dấu hiệu, số nguyên, bước hoặc thành phần, hoặc các nhóm của chúng. Do đó, ví dụ, axit nucleic hoặc protein chứa trình tự các nucleotit hoặc axit amin, có thể chứa nhiều nucleotit hoặc axit amin hơn so với các axit nucleic và protein được đề cập thực tế, tức là được gộp vào axit nucleic hoặc protein lớn hơn. Gen khảm chứa trình tự ADN được xác định về mặt chức năng hoặc cấu trúc, có thể chứa các trình tự ADN bổ sung, như trình tự khởi đầu hoặc trình tự kết thúc phiên mã.

Sáng chế còn đề cập đến việc phát triển sự kiện ưu tú EE-GM3 ở cây đậu tương mang sự kiện này, cây con và hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ cây này và tế bào thực vật, hoặc vật liệu thực vật thu được từ các cây mang sự kiện này. Các cây mang sự kiện ưu tú EE-GM3 có thể thu được như được bộc lộ trong Ví dụ 1. Sáng chế còn đề cập đến hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659 hoặc dẫn xuất của chúng mang sự kiện ưu tú EE-GM3. Thuật ngữ “dẫn xuất (của hạt)” được sử dụng theo sáng chế để chỉ các cây có thể trồng được từ hạt này, cây con tạo ra từ bước lai chéo hoặc lai ngược, cũng như các tế bào thực

vật, các cơ quan, bộ phận, mô, dịch nuôi cấy tế bào, thể nguyên sinh, và vật liệu thực vật thu được từ chúng.

Các cây đậu tương hoặc vật liệu thực vật mang EE-GM3 có thể được nhận dạng theo quy trình nhận dạng theo PCR đã được mô tả đối với EE-GM3 trong Ví dụ 2. Một cách vắn tắt, ADN hệ gen đậu tương có mặt trong mẫu sinh học được khuếch đại theo phương pháp PCR bằng cách sử dụng đoạn mồi mà nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong trình tự bên sườn đầu 5' hoặc 3' của EE-GM3 như đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5, và đoạn mồi mà nhận dạng trình tự trong ADN ngoại lai, như đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4. Các đoạn mồi ADN khuếch đại phần trình tự đậu tương nội sinh được sử dụng làm đối chứng dương cho bước khuếch đại PCR. Nếu khi khuếch đại theo phương pháp PCR, vật liệu này tạo ra đoạn có kích thước mong đợi, thì vật liệu này chứa vật liệu thực vật từ cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

Các cây mang EE-GM3 được đặc trưng bởi khả năng chịu được glyphosat của chúng, cũng như khả năng chịu được các chất ức chế HPPD như isoxaflutol của chúng. Các cây mang EE-GM3 còn được đặc trưng bởi các đặc tính nông học tương đương với các giống đậu tương có bán trên thị trường, khi không dùng thuốc diệt cỏ. Đã quan sát thấy rằng sự có mặt của ADN ngoại lai trong vùng cài xen của hệ gen cây đậu tương theo sáng chế tạo ra các đặc tính kiểu hình và các tính chất phân tử đặc biệt đáng quan tâm cho cây mang sự kiện này.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất sự kiện ưu tú ở các cây đậu tương, thu được bằng cách cài xen 2 gen chuyển ở vị trí cụ thể trong hệ gen của đậu tương, sự kiện ưu tú này truyền tính trạng chịu được glyphosat và chất diệt cỏ ức chế HPPD như isoxaflutol cho các cây đậu tương này, và trong đó sự kiện ưu tú này không gây ảnh hưởng đến năng suất trồng trọt của đậu tương mà tác động một cách tiêu cực đến sản lượng của các cây đậu tương này, so với các dòng đồng hợp tử (các thuật ngữ "dòng đồng hợp tử" hoặc "dòng gần như đồng hợp tử" được sử dụng theo sáng chế có nghĩa là các dòng đậu tương có cùng nền tảng di truyền nhưng không có các gen chuyển, như các cây có cùng nền tảng di truyền với cây được dùng để biến nạp, hoặc dòng chị em phân ly mất các gen chuyển). Đặc biệt, sáng chế đề xuất sự kiện ưu tú ở các cây đậu tương, trong đó sự cài xen hoặc sự có mặt của sự kiện ưu tú này trong hệ gen của các cây đậu tương này không làm tăng khả năng nhiễm bệnh, không làm giảm sản

lượng, hoặc không làm tăng sự đổ gãy, ở các cây đậu tương này, so với các dòng đồng hợp tử. Do đó, sáng chế đề xuất sự kiện ưu tú ở các cây đậu tương, được ký hiệu là EE-GM3, tạo ra các cây đậu tương có thể chịu được glyphosat và chất diệt cỏ ức chế HPPD (đồng thời hoặc riêng rẽ) mà không tác động một cách tiêu cực đến sản lượng của cây đậu tương này so với các dòng đồng hợp tử, các cây đậu tương này không có khác biệt có ý nghĩa thống kê về khả năng nhiễm bệnh, hoặc sự đổ gãy, so với các cây đậu tương đồng hợp tử. Các đặc tính đó làm cho sự kiện ưu tú này rất đáng quan tâm trong việc phòng trừ cỏ dại chịu được glyphosat trên cánh đồng đậu tương, và có thể được sử dụng trong các phương pháp ngăn ngừa hoặc làm trễ sự hình thành thêm tính kháng glyphosat trên cánh đồng đậu tương (ví dụ, bằng cách sử dụng glyphosat và isoxaflutol, đảm bảo áp dụng được 2 cơ chế hoạt động trên cánh đồng đậu tương).

Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương hoặc một phần của nó mang sự kiện EE-GM3, trong đó hạt đậu tương đại diện mang sự kiện EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu 41659. Sáng chế còn đề xuất hạt của các cây này, mang sự kiện này, cũng như sản phẩm đậu tương được tạo ra từ các hạt này, trong đó sản phẩm đậu tương nêu trên mang sự kiện EE-GM3. Sản phẩm đậu tương này có thể là hoặc có thể bao gồm bột xay thô, hạt nghiền, bột, vảy, v.v.. Đặc biệt, sản phẩm đậu tương này chứa axit nucleic tạo ra đơn vị siêu sao chép phát hiện hoặc đặc hiệu đối với sự kiện EE-GM3, đơn vị siêu sao chép này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 hoặc 3. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm đậu tương, bao gồm bước thu hạt đậu tương mang sự kiện EE-GM3, và tạo ra sản phẩm đậu tương này của nó.

Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương, là cây con của cây bất kỳ trong số các cây đậu tương nêu trên, và mang sự kiện EE-GM3.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất cây đậu tương chịu được các thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, phương pháp này bao gồm bước đưa vào hệ gen của cây này sự kiện EE-GM3, đặc biệt là bằng cách lai chéo cây đậu tương thứ nhất không có sự kiện EE-GM3 với cây đậu tương mang EE-GM3, và bước chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol.

Sáng chế còn đề xuất cây chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, đặc biệt là không làm giảm sản lượng, và có các đặc tính nông học chấp nhận được, chứa protein 2mEPSPS và HPPD, và có khả năng tạo ra đơn vị siêu sao chép để phát hiện sự kiện

EE-GM3. Sáng chế còn đề xuất đơn vị siêu sao chép phân lập đặc hiệu (các đoạn trình tự ADN) như các đơn vị siêu sao chép có thể thu được bằng cách sử dụng các công cụ phát hiện đặc hiệu theo sáng chế, đặc biệt là các đơn vị siêu sao chép có trình tự bao gồm đoạn ADN có nguồn gốc từ ADN thực vật và đoạn ADN ngoại lai hoặc khác loài đối với thực vật này, như ADN cài xen vào hệ gen của thực vật này bằng cách biến nạp theo sáng chế.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng đậu tương mang gen EE-GM3, hoặc cánh đồng sẽ trồng cây đậu tương này, bao gồm bước xử lý cánh đồng bằng lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ gốc isoxaflutol, trong đó các cây đậu tương này chịu được thuốc diệt cỏ đó.

Sáng chế còn đề xuất ADN chứa trình tự SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự gần như tương đồng với nó, và cây, tế bào, mô hoặc hạt bất kỳ, đặc biệt là đậu tương, chứa trình tự ADN này, như cây, tế bào, mô, hoặc hạt mang EE-GM3, đặc biệt là ADN chứa 2 vùng cạnh nhau chứa hoặc (chủ yếu) gồm SEQ ID NO. 1, hoặc ADN chứa 2 vùng cạnh nhau chứa hoặc bao gồm SEQ ID NO. 1 với một số nucleotit được thay đổi, xóa bỏ hoặc bổ sung, như ADN chứa SEQ ID NO. 1 lặp lại có 4, 6, 8, hoặc 10 nucleotit được xóa bỏ hoặc thay thế, nằm gần (như nằm cách từ 200 đến 500 nucleotit, hoặc ít hơn 2000 hoặc 10.000 nucleotit) với nhau. Theo một phương án, khía cạnh này bao gồm ADN của SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 2257 đến vị trí nucleotit 16601 trong đó 2, 4, 6, 8 hoặc 10 nucleotit đã được thay thế bằng các nucleotit khác, hoặc trong đó 2, 4, 6, 8 hoặc 10 nucleotit đã bị xóa bỏ hoặc được bổ sung vào, hoặc ADN của SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 2257 đến vị trí nucleotit 16601 của SEQ ID NO. 11, cũng như ADN của SEQ ID NO. 11, và cây, tế bào, mô hoặc hạt bất kỳ, đặc biệt là đậu tương, chứa trình tự ADN bất kỳ trong số các trình tự ADN này. Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương, tế bào, mô hoặc hạt bất kỳ, chứa trình tự ADN (khác loài hoặc là ngoại lai đối với cây, hạt, mô hoặc tế bào đậu tương thông thường) của SEQ ID NO. 11, hoặc chứa trình tự ADN của SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 2257 đến vị trí nucleotit 16601, hoặc chứa trình tự ADN có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 99% hoặc 99,5% với trình tự SEQ ID NO. 11, hoặc chứa trình tự ADN có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 99% hoặc 99,5% với trình tự SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 2257 đến vị trí nucleotit 16601.

Sáng chế còn đề xuất cây, tế bào thực vật, mô, hoặc hạt đậu tương chuyển gen, mà hệ gen của chúng mang sự kiện EE-GM3 đặc trưng bởi phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit gần như tương đồng với SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1441 đến nucleotit 1462 và phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit gần như tương đồng với SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên, cũng như cây đậu tương, tế bào thực vật, mô, hoặc hạt, mà hệ gen của chúng mang sự kiện EE-GM3 đặc trưng bởi phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit gần như tương đồng với SEQ ID NO. 2 và phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit gần như tương đồng với SEQ ID NO. 3, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương, tế bào, mô hoặc hạt, mang EE-GM3, được đặc trưng bởi hệ gen của các tế bào của chúng chứa trình tự axit nucleic có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 và trình tự axit nucleic có mức độ đồng nhất trình tự ít nhất là 80%, 90%, 95% hoặc 100% với SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

Thuật ngữ "isoxaflutol" theo sáng chế chỉ thuốc diệt cỏ isoxaflutol [tức là (5-xyclopropyl-4-isoxazolyl)[2-(metylsulfonyl)-4-(triflometyl)phenyl]metanon], chất chuyển hóa hoạt tính của nó, diketonitril, và hỗn hợp hoặc dung dịch bất kỳ chứa các hợp chất này. Các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD hữu ích để sử dụng trên sự kiện theo sáng chế là diketonitril, ví dụ, 2-xyano-3-xyclopropyl-1-(2-metylsulphonyl-4-triflometylphenyl)-propan-1,3-đion và 2-xyano-1-[4-(metylsulphonyl)-2-triflometylphenyl]-3-(1-metyl-xyclopropyl)propan-1,3-fion; các isoxazol khác; và các pyrazolinat, ví dụ, topramezon [tức là [3-(4,5-đihydro-3-isoxazolyl)-2-metyl-4-(metylsulfonyl)phenyl](-5-hydroxy-1-metyl-1H-pyrazol-4-yl)metanon], và pyrasulfotole [(5-hydroxy-1,3-dimetylpyrazol-4-yl)(2-mesyl-4-trifluarometylphenyl)metanon]; hoặc pyrazofen [2-[4-(2,4--điclobenzoyl)-1,3-dimetylpyrazol-5-yloxy]axetophenon].

Theo một phương án của sáng chế, cánh đồng sẽ trồng cây đậu tương mang sự kiện EE-GM3, có thể được xử lý bằng chất diệt cỏ ức chế HPPD, như isoxaflutol (IPT'), trước khi trồng cây đậu tương hoặc gieo hạt đậu tương đó, để làm sạch cỏ dại trên cánh đồng nhờ chất ức chế HPPD, để không cạnh tranh, tiếp theo trồng cây hoặc gieo hạt đậu tương trên cánh đồng đã được xử lý sơ bộ đó (xử lý cháy nhanh bằng cách sử dụng chất diệt cỏ ức chế HPPD). Tác dụng còn lại của IFT cũng sẽ bảo vệ các

cây đậu tương nảy mầm và phát triển khỏi sự cạnh tranh của cỏ dại trong các giai đoạn phát triển đầu tiên. Khi cây đậu tương đạt được kích thước nhất định, và cỏ dại có xu hướng tái xuất hiện, glyphosat, hoặc hỗn hợp chất ức chế HPPD - glyphosat, có thể được sử dụng làm thuốc diệt cỏ sau nảy mầm lên ngọn các cây này.

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

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

Cũng theo sáng chế, các cây đậu tương mang EE-GM3 có thể được xử lý bằng các thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ hoặc thuốc trừ nấm sau đây hoặc các hạt đậu tương mang EE-GM3 có thể được phủ bằng lớp phủ chứa các thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ hoặc thuốc trừ nấm sau đây:

Các thuốc diệt cỏ dùng cho đậu tương:

Alaclo, Bentazone, Trifluralin, Cloimuron-Etyl, Cloransulam-Metyl, Fenoxaprop, Fomesafen, Fluazifop, Glyphosat, Imazamox, Imazaquin, Imazethapyr, (S-)Metolaclo, Metribuzin, Pendimethalin, Tepraloxymid, Isoxaflutol.

Các thuốc trừ sâu dùng cho đậu tương:

Lambda-cyhalothrin, Methomyl, Parathion, Thiocarb, Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Thiacloprid, Acetamiprid, Dinetofuran, Flubendiamide, Rynaxypyr, Cyazypyr, Spinosad, Spinotoram, Enamectin-Benzoyate, Fipronil, Ethiprole, Deltamethrin, β -Cyfluthrin, gamma và lambda Cyhalothrin, 4-[[[(6-Chloropyridin-3-yl)methyl](2,2-difluorethyl)amino]furan-2(5H)-on, Spirotetramat, Spinodiclofen, Triflumuron, Flonicamid, Thiodicarb, beta-Cyfluthrin.

Các thuốc diệt nấm dùng cho đậu tương:

Azoxystrobin, Cyproconazole, Epoxiconazole, Flutriafol, Pyraclostrobin, Tebuconazole, Trifloxystrobin, Prothioconazole, Tetraconazole.

Các ví dụ sau mô tả sự phát triển và nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3, sự phát triển các dòng đậu tương khác nhau mang sự kiện này, và sự phát triển các công cụ nhận dạng một cách đặc hiệu sự kiện ưu tú EE-GM3 trong các mẫu sinh học.

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

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

Cần phải hiểu rằng nhiều thông số trong quy trình thử nghiệm bất kỳ như các quy trình PCR trong phần Ví dụ dưới đây có thể cần được điều chỉnh theo các điều kiện thử nghiệm cụ thể, và có thể được điều chỉnh một chút để thu được kết quả tương tự. Ví dụ, việc áp dụng phương pháp khác để tạo ra ADN hoặc việc lựa chọn các đoạn

mỗi khác theo phương pháp PCR có thể đòi hỏi các điều kiện tối ưu khác đối với quy trình PCR. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết rõ các điều chỉnh này, và các điều chỉnh này được bộc lộ một cách chi tiết hơn trong các hướng dẫn áp dụng PCR hiện có.

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

SEQ ID NO. 1 : trình tự nucleotit của đoạn *Sall* của vectơ pSF10.

SEQ ID NO. 2: trình tự nucleotit chứa vùng đầu 5' bên sườn ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3.

SEQ ID NO. 3: trình tự nucleotit chứa vùng đầu 3' bên sườn ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3.

SEQ ID NO. 4: đoạn mồi SOY028

SEQ ID NO. 5: đoạn mồi SOY029

SEQ ID NO. 6: đoạn mồi SMP187

SEQ ID NO. 7: đoạn mồi STV019

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

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

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

SEQ ID NO. 11: trình tự nucleotit của ADN ngoại lai và các trình tự bên sườn trong EE-GM3 của thực vật

SEQ ID NO. 12: đoạn mồi SHA130

SEQ ID NO. 13: đoạn mồi SHA178

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

1.1. Mô tả ADN ngoại lai chứa các gen khả năng 2mEPSPS và HPPD-Pf-W336

Plasmid pSF10 là vectơ nhân dòng thu được từ pUC19 chứa gen khả năng *2mepsps* và gen khả năng *hppd*-Pf-W336 nằm trên đoạn *Sall* khoảng 7,3 kb. Chi tiết về ADN nằm giữa hai vị trí cắt giới hạn *Sall* được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây. Trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO. 1.

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

Vị trí nucleotit	Định hướng	Mô tả và tài liệu tham khảo
188-479	bổ sung	3' nos: trình tự bao gồm vùng không dịch mã ở đầu 3' của gen nopaline synthase từ T-ADN của pTiT37 của <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker et al. 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics, 1, 561-573)
480-1556	bổ sung	hpdPf W336: trình tự mã hóa 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase của chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> A32 đã được biến đổi bằng cách thay thế axit amin Glyxin 336 bằng Tryptophan, như đã được bộc lộ bởi Boudec và các đồng tác giả (2001), US 6245968B1
1557-1928	bổ sung	TPotp Y: trình tự mã hóa chất dẫn xuất peptit trung chuyển đã được tối ưu hóa (vị trí 55 thay đổi thành Tyrosin), chứa trình tự của các gen tiểu đơn vị nhỏ RuBisCO của <i>Zea mays</i> (ngô) và <i>Helianthus annuus</i> (hướng dương), như đã được bộc lộ bởi Lebrun và các đồng tác giả (1996) US5510471
1929-2069	bổ sung	5'tev: trình tự bao gồm trình tự dẫn đầu của virus gây bệnh Etching ở cây thuốc lá như đã được bộc lộ bởi Carrington và Freed (1990) Journal of Virology, 64, 1590-1597
2070-3359	bổ sung	Ph4a748 ABBC: trình tự bao gồm vùng trình tự khởi đầu gen histon H4 của <i>Arabidopsis thaliana</i> , chứa đột biến lặp đoạn bên trong (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
3360-4374		Ph4a748: trình tự bao gồm vùng trình tự khởi đầu gen histon H4 của <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté et al., 1987) Plant Molecular Biology, 8, 179-191.
4375-4855		intron1 h3At: intron thứ nhất của gen II của biến thể histon H3.III của <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chaubet et al., 1992) Journal of Molecular Biology, 225, 569-574.
4856-5227		TPotp C: trình tự mã hóa peptit trung chuyển đã được tối ưu

		hóa, chứa trình tự của các gen tiểu đơn vị nhỏ RuBisCO của <i>Zea mays</i> (ngô) và <i>Helianthus annuus</i> (hướng dương), như đã được bộc lộ bởi Lebrun và các đồng tác giả (1996) US5510471
5228-6565		2mepsps: trình tự mã hóa gen 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphat synthaza đột biến kép của <i>Zea mays</i> (ngô) (Lebrun et al., 1997) WO9704103-A1
6566-7252		3' histonAt: trình tự bao gồm vùng không dịch mã ở đầu 3' của gen histon H4 của <i>Arabidopsis thaliana</i> (Chabouté et al., 1987) 6566-7252 Plant Molecular Biology, 8, 179-191.

1.2. Sự kiện EE-GM3

Đoạn pSF10 đã được duỗi thẳng bằng Sall đã được tinh chế theo phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) khoảng 7,3 kb (mang gen chịu được glyphosat 2mEPSPS và gen chịu được chất ức chế HPPD *HPPD-Pf- W336*) được sử dụng để tạo ra các cây đậu tương đã được biến nạp bằng cách chuyển gen thẳng vào các tế bào đậu tương kiểu Jack (Nickell, C. D., G. R. Noel, D. J. Thomas, and R. Waller. Registration of 'Jack' soybean. *Crop Sci.* 1365. 30,1990), tiếp theo tái sinh các tế bào thực vật đã được biến nạp vào các cây đậu tương hữu thụ chuyển gen.

1.2.1 Nhận dạng sự kiện ưu tú EE-GM3

Sự kiện ưu tú EE-GM3 được chọn lọc theo quy trình chọn lọc rộng rãi trên cơ sở khả năng biểu hiện tốt và tính ổn định của các gen chịu được thuốc diệt cỏ, và đánh giá tính tương thích của nó với các đặc tính nông học tối ưu như chiều cao của cây, chiều cao đến mấu, khả năng đứng, sinh lực, năng suất hạt. Các cây đậu tương mang sự kiện này được chọn trong số nhiều sự kiện biến nạp khác nhau thu được bằng cách sử dụng cùng các gen khảm. Thông số được sử dụng ở bước lựa chọn sự kiện này là: a) khả năng chịu tốt đối với thuốc diệt cỏ isoxaflutol trong các thử nghiệm trên cánh đồng, b) khả năng chịu tốt đối với thuốc diệt cỏ glyphosat trong các thử nghiệm trên cánh đồng, c) khả năng chịu tốt đối với thuốc diệt cỏ kết hợp isoxaflutol và glyphosat trong các thử nghiệm trên cánh đồng, d) sự cài xen gen chuyển chịu được thuốc diệt cỏ vào một locus trong hệ gen cây đậu tương, không có khung vector, e) đặc tính nông học chung tương tự với cây bố mẹ được dùng để biến nạp (độ thành thực, sự đổ gãy, tính miễn

cảm đối với bệnh, v.v.), và f) không làm giảm đáng kể sản lượng do cài xen ADN gây biến nạp (so với dòng đồng hợp tử không mang sự kiện này, như dòng thực vật được dùng để biến nạp, phát triển trong cùng điều kiện như vậy).

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

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

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

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

Hạt (thế hệ T2) thu được từ các cây T1 tự thụ phấn trồng trên cánh đồng được gieo "trồng theo hàng". Phân tích chi bình phương của dữ liệu phân ly cho các hàng (chịu được hoàn toàn hoặc chịu được một phần) và của từng cây trong hàng (chịu được hoặc nhạy cảm) thể hiện hiện tượng di truyền theo thuyết Menden như mong đợi của một đột biến cài xen cho EE-GM3.

Tiếp tục lựa chọn và gia tăng hạt cho đến khi một dòng đồng hợp tử sự kiện biến nạp EE-GM3 được xác định và được chọn cho quá trình tạo hạt trung tâm trong thế hệ thứ tư. Sau đó, hạt thế hệ T5 được dùng làm ứng viên để phát triển các giống khác nhau. Các cây thuộc thế hệ thứ sáu (thế hệ T6) được lai chéo với dòng nhân giống đậu tương thông thường theo chương trình nhập gen được thiết kế để chuyển sự kiện này vào phôi đậu tương thương mại có lượng đa dạng di truyền lớn hơn. Các cây lai F1 (dòng EE-GM3 x dòng thông thường) được cho phát triển đến thành thực và hạt F2 được trồng. Các mẫu lá của 901 cây F2 được phân tích bằng các đoạn mồi PCR đã

được tạo ra để xác định trạng thái tiếp hợp giao tử của đột biến cài xen EE-GM3. Đã quan sát được tỷ lệ mong đợi 1:2:1 đối với tỷ lệ phân ly một đột biến cài xen theo các quy luật của Mendel.

Sự kiện EE-GM3 đã chọn được đưa vào các nền tảng di truyền thương mại khác nhau, và so sánh kết quả của các thử nghiệm trên cánh đồng ở các nơi khác nhau. Các cây được thử bằng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ isoxaflutol bằng cách áp dụng nhiều phương pháp xử lý khác nhau. Các cây này thể hiện khả năng chịu tốt đối với thuốc diệt cỏ. Hàng trăm cây đậu tương khác nhau mang sự kiện EE-GM3 được sử dụng trong nghiên cứu di truyền, và các thuốc diệt cỏ được sử dụng. Sau đó, các dòng đã chọn từ thử nghiệm này được nhân lên trên cánh đồng và cũng được xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Từ thử nghiệm đó, 50 dòng đã chọn được nhân lên, và chúng cũng được xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Điểm số về độc tính đối với thực vật cho các dòng sau này đã được phun isoxaflutol và glyphosat thể hiện một số thay đổi về đáp ứng, nhưng khoảng đáp ứng ở các dòng này thể hiện khuynh hướng thay đổi tương tự như quan sát được qua 4 bản sao của sự kiện EE-GM3 trong nền Jack ban đầu, được phát triển trong cùng các điều kiện xử lý và môi trường. Do đó, đã quan sát được khả năng chịu các thuốc diệt cỏ tương ứng trên một lượng lớn phôi cho các cây mang EE-GM3.

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

Trong một mùa, tiến hành nghiên cứu tại 10 địa điểm để so sánh năng suất trồng trọt của đậu tương chịu được hai thuốc diệt cỏ mang sự kiện biến nạp EE-GM3 so với giống bố mẹ biến nạp, Jack và một số giống đậu tương không chuyển gen. Bằng cách áp dụng thiết kế kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh, các cây EE-GM3 được trồng vào các luống lặp lại với thuốc kiểm soát cỏ dại thông thường hoặc các thuốc diệt cỏ dự kiến, glyphosat và isoxaflutol. Các luống cây đậu tương mang sự kiện biến nạp EE-GM3 được phun thuốc diệt cỏ isoxaflutol với nồng độ đích 70 gam hoạt chất/hecta và thuốc diệt cỏ glyphosat với nồng độ đích 1060 gam hoạt chất/hecta. Việc dùng thuốc diệt cỏ được thực hiện đối với cây này bằng cách phun vào lá ở giai đoạn phát triển V4-V5. Thực hiện các quan sát về mặt nông học vào đầu mùa, giữa mùa và cuối mùa.

Mật độ cây (thông số; số lượng cây non) đối với luống Jack và luống của giống không chuyển gen là cao hơn luống mang sự kiện EE-GM3 một độ lệch chuẩn. Khác biệt về số lượng cây non đầu mùa có thể là do chất lượng lô hạt, vì hạt cho cây mang EE-GM3 được sản xuất trong vườn ươm trái mùa, trong khi hạt của giống không chuyển gen được sản xuất trong mùa sản xuất bình thường lân cận với Hoa Kỳ. Tuy nhiên, số ngày để đạt được mức độ nảy mầm 50% và xếp hạng về sức sống của cây là như nhau, chứng tỏ rằng các mẻ hạt này là tương đương về các thông số năng suất. Ở các cây non cuối mùa, Jack và giống không chuyển gen vẫn khác các cây EE-GM3 một độ lệch chuẩn. Sản lượng theo luống của các cây mang sự kiện EE-GM3 cũng thấp hơn của Jack một độ lệch chuẩn, có lẽ là do mật độ cây ở các luống mang sự kiện EE-GM3 thấp hơn. Sản lượng của giống không chuyển gen là cao hơn Jack như dự đoán do ưu thế về sản lượng tiềm năng thấy ở các giống gần đây.

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

Một mùa thử nghiệm là mùa có mưa bất thường, và mức độ thiệt hại mùa màng ở các cây mang EE-GM3 sau khi được dùng thuốc diệt cỏ dự kiến là rõ ràng hơn so với mức độ quan sát được ở các mùa khác. Các đánh giá trên cánh đồng còn bao gồm việc theo dõi các đặc tính về sức sống (sinh sản, kháng bệnh, sức sinh sản, mức độ phát tán hạt, tình trạng ngủ của hạt, mức độ bền bỉ của hạt). Các cây mang EE-GM3 và các cây Jack không khác nhau về các đặc tính sinh sản; số ngày để nảy mầm, số ngày ra hoa đến 50% và số ngày quả chín đến 90%. Không thấy khác biệt về phản ứng đối với sự tàn phá tự nhiên của bệnh ở cây và côn trùng gây hại. Mặc dù EE-GM3 tạo ra sản lượng cuối cùng thấp hơn Jack, không quan sát thấy sự khác biệt về sức sinh sản

(trọng lượng 100 hạt). Việc đánh giá các thông số về mức độ phát tán hạt (vỡ quả đổ và sự đổ gãy cây) cho thấy rằng EE-GM3 và Jack có cùng số điểm về mức độ vỡ quả đổ, nhưng các cây EE-GM3 dường như ít có xu hướng bị đổ gãy. Đánh giá hạt thu được từ 10 nơi không cho thấy mối quan ngại nào trong thử nghiệm nảy mầm hoặc thử nghiệm tình trạng ngủ của hạt.

Trong các thử nghiệm trong mùa mưa bất thường, sản lượng cuối cùng của các cây EE-GM3, bất kể việc xử lý phòng trừ cỏ dại thế nào, là thấp hơn sản lượng của Jack một độ lệch chuẩn (có lẽ là do mật độ cây ở các luống mang sự kiện EE-GM3 thấp hơn). Trong mùa ẩm ướt khác thường, thương tổn cây trồng (gây bạc từ 10 đến 30% diện tích trồng) được thông báo đối với các luống EE-GM3 đến sáu tuần sau khi phun vào lá các thuốc diệt cỏ glyphosat và isoxaflutol. Tuy nhiên, cho đến khi thành thực, tất cả các luống đều được xếp hạng sức khỏe cây là "không thương tổn". Mong đợi rằng các thử nghiệm lặp lại trên cánh đồng tại nhiều địa điểm với EE-GM3 được đưa vào nền tảng di truyền của giống đậu tương ưu tú, so với các dòng chị em gần như đồng hợp tử không mang gen chuyển, không cho thấy sự khác biệt nào về sản lượng giữa các cây mang sự kiện EE-GM3 và dòng gần như đồng hợp tử (khi không được xử lý bằng thuốc diệt cỏ).

Hơn nữa, trong thử nghiệm lặp lại trên cánh đồng, đã quan sát thấy khả năng chống chịu đáng kể của cây trồng (gây bạc dưới 10%) ở các cây đậu tương mang EE-GM3 khi được xử lý trước khi nảy mầm hoặc sau khi nảy mầm bằng IFT (70g hoạt chất/hecta với 0,5% NIS, do Agridex cung cấp), khả năng chống chịu đáng kể của cây trồng (gây bạc dưới 10%) còn được quan sát thấy ở các cây đậu tương mang EE-GM3 khi được xử lý sau khi nảy mầm bằng pyrasulfotole (35g hoạt chất/hecta với 0,5% NIS, do Agridex cung cấp), là một chất diệt cỏ khác cũng ức chế HPPD.

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

Trình tự của các vùng bên sườn ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong sự kiện ưu tú EE-GM3 được xác định như sau:

1.2.2.1. Vùng bên sườn phải (đầu 5')

Đoạn được nhận dạng chứa vùng bên sườn đầu 5' được xác định trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID NO. 2. Trình tự từ nucleotit 1 đến

nucleotit 1451 tương ứng với ADN thực vật, trong khi trình tự từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 tương ứng với ADN ngoại lai.

1.2.2.2. Vùng bên sườn trái (đầu 3')

Đoạn được nhận dạng chứa vùng bên sườn đầu 3' được xác định trình tự và trình tự nucleotit của nó được thể hiện trong SEQ ID NO. 3. Trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 tương ứng với ADN ngoại lai, trong khi trình tự từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408 tương ứng với ADN thực vật.

1.2.2.3. ADN ngoại lai mang các gen EE-GM3 truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ

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

Do đó, ADN ngoại lai mang các gen EE-GM3 truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ chứa theo thứ tự các trình tự sau:

- từ nucleotit 1 đến nucleotit 199: trình tự nucleotit tương ứng với phần bổ sung của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 6760 đến nucleotit 6958;
- từ nucleotit 200 đến nucleotit 624: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 6874 đến nucleotit 7298;
- từ nucleotit 625 đến nucleotit 7909: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 7 đến nucleotit 7291;
- từ nucleotit 7910 đến nucleotit 15163: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 12 đến nucleotit 7265; và
- từ nucleotit 15164 đến nucleotit 15187: trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 217 đến nucleotit 240 (trình tự này không tương ứng với ADN plasmit pSF10 hoặc ADN thực vật wt và do đó được gọi là ADN lấp đầy).

ADN ngoại lai này được nằm ngay trước và liền kề với ADN ngoại lai bởi trình tự bên sườn đầu 5' của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến 1451 và nằm tiếp ngay sau và liền kề với ADN ngoại lai bởi trình tự bên sườn đầu 3' của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408.

Việc xác định trình tự ADN đầy đủ đã xác nhận đối với cả trình tự ADN ngoại lai và các trình tự ADN bên sườn ở EE-GM3 tạo ra trình tự đã được thông báo ở SEQ ID NO. 11. Trong trình tự này, ADN cài xen là từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638, và 2 bản sao gần như đầy đủ của pSF10 nằm theo hướng đầu nối đuôi là từ nucleotit 2257 đến nucleotit 16601. Trình tự ADN bên sườn ở đầu 5' trong SEQ ID NO. 11 là trình tự từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 trong SEQ ID NO. 11, và trình tự ADN bên sườn ở đầu 3' trong SEQ ID NO. 11 là trình tự từ nucleotit 16639 đến nucleotit 17806 trong SEQ ID NO. 11.

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

2.1. Các đoạn mồi

Các đoạn mồi đặc hiệu được phát triển để nhận dạng trình tự trong sự kiện ưu tú này.

Đoạn mồi được phát triển để nhận dạng trình tự nằm trong vùng bên sườn đầu 3' của EE-GM3. Sau đó, đoạn mồi thứ hai được chọn trong trình tự của ADN ngoại lai sao cho các đoạn mồi trải dài trên trình tự có khoảng 263 nucleotit. Các đoạn mồi sau đây được phát hiện ra là cho kết quả rõ ràng và lặp lại được trong phản ứng PCR đối với ADN của EE-GM3:

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

(đích: ADN cài xen)

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

(đích: ADN của cây)

Tốt hơn, nếu hỗn hợp PCR gồm các đoạn mồi hướng đích trình tự nội sinh. Các đoạn mồi này làm đối chứng nội ở mẫu chưa biết và ở đối chứng ADN dương tính. Kết quả dương tính với cặp đoạn mồi nội sinh (có mặt đoạn đã được khuếch đại nhờ PCR có 413 cặp bazơ) chỉ ra rằng có nhiều ADN với chất lượng thích hợp trong chế

phẩm ADN hệ gen để tạo ra sản phẩm PCR. Các đoạn mỗi nội sinh được chọn để nhận dạng gen actin nội sinh của đậu tương:

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

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

2.2. Các đoạn đã được khuếch đại

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

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

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

2.3. ADN khuôn

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

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

Để tránh lỗi dương tính hoặc âm tính giả, đã xác định được rằng các đối chứng dương tính và âm tính sau cần được đưa vào quá trình thực hiện PCR:

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

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

- Đối chứng ADN kiểu hoang. Đây là PCR trong đó ADN khuôn được cung cấp là ADN hệ gen điều chế được từ cây không chuyển gen. Kết quả mong đợi quan sát được không phải là khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà là khuếch đại sản phẩm PCR nội sinh chỉ ra rằng không có sự khuếch đại nền gen chuyển ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

2.5. Các điều kiện PCR

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

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

20ng ADN khuôn

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

0,5µl dNTP 10 mM

0,4µl SOY01 (10pmol/µl)

0,4µl SOY02 (10pmol/µl)

0,7µl SOY028 (10pmol/µl)

0,7µl SOY029 (10pmol/µl)

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

nước đến 25µl

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

4 phút ở 95°C

Tiếp theo: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp theo: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 25 chu kỳ

Tiếp theo: 10 phút ở 72°C

2.6. Phân tích gel agarosa

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

2.7. Xác minh kết quả

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

Khi thực hiện quy trình xác định EE-GM3 bằng PCR như nêu trên, các đường thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và nội sinh với kích thước mong đợi, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN khuôn hệ gen đã được chuẩn bị, đã kế thừa sự kiện ưu tú EE-GM3. Các đường không thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR nội sinh, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN khuôn hệ gen đã được chuẩn bị, không mang sự kiện ưu tú. Các đường không thể hiện lượng nhìn thấy được của cả sản phẩm PCR nội sinh và sản phẩm PCR chuyển gen, chỉ ra rằng chất lượng và/hoặc số lượng ADN hệ gen không cho phép tạo ra sản phẩm PCR. Cây này sẽ không được tính đến. Việc điều chế ADN hệ gen cần được lặp lại và cần thực hiện PCR mới với các đối chứng thích hợp.

2.8. Áp dụng quy trình PCR phân biệt để xác định EE-GM3

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

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

Vật liệu lá của nhiều cây đậu tương, một vài trong số đó mang EE-GM3 được thử nghiệm theo quy trình nêu trên. Các mẫu của sự kiện ưu tú EE-GM3 và mẫu đậu tương kiểu hoang lần lượt được lấy làm đối chứng dương tính và đối chứng âm tính.

Hình 2 minh họa kết quả thu được theo quy trình nhận dạng sự kiện ưu tú theo PCR đối với EE-GM3 ở nhiều mẫu cây đậu tương. Các mẫu trên các đường 2 và 3 được thấy là mang sự kiện ưu tú EE-GM3 vì dải có 263 cặp bazơ được phát hiện, trong khi các mẫu trên các đường 4 đến 8 không mang EE-GM3. Các đường 6 và 7 chứa các mẫu của các sự kiện biến nạp đậu tương khác thu được bằng cách sử dụng cùng các gen khảm chịu được thuốc diệt cỏ; đường 8 chứa ADN từ các cây đậu tương kiểu hoang và đường 9 thể hiện mẫu đối chứng âm tính (nước), các đường 1 và 10 thể hiện chất đánh dấu phân tử lượng (thang 100 cặp bazơ).

2.9. Thử nghiệm dPCR để phát hiện EE-GM3 trong hạt đã được phân nhóm

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

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

Đoạn môi xuôi gắn đích trình tự ADN T:

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

Đoạn môi ngược gắn đích trình tự bên sườn đầu 3':

SMP178 5' - TgA.ggC.ACg.TAT.TgA.TgA.ee - 3' (SEQ ID NO. 13)

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

Phản ứng PCR đích được thực hiện trên khoảng 200ng ADN khuôn được chuẩn bị từ hạt đã được nhóm và nghiền theo kit tinh chế chiết ADN Gentra Puregen đã được biến đổi (do Qiagen cung cấp). Khi sử dụng ADN điều chế được theo các phương pháp khác, thì nên tiến hành thử nghiệm bằng cách sử dụng các mẫu với lượng tương đối EE-GM3 đã biết.

Tốt nhất, nếu phản ứng PCR hệ quy chiếu đã được xác minh, hướng đích trình tự nội sinh, được thực hiện theo từng lần chạy PCR riêng rẽ để xác minh tính phù hợp của mẫu ADN cho phân tích PCR để tránh các kết quả âm tính sai.

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

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

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

- Đối chứng ADN kiểu hoang cũng có thể được bổ sung vào PCR này. Đây là PCR trong đó ADN khuôn được cung cấp là ADN hệ gen điều chế được từ cây không chuyển gen. Kết quả mong đợi quan sát được không phải là khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà là khuếch đại sản phẩm PCR nội sinh chỉ ra rằng không có sự khuếch đại nền gen chuyển ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

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

Tất nhiên, các polymeraza Taq khác có thể được sử dụng, và lúc đó các điều kiện có thể khác với các điều kiện do nhà sản xuất đề xuất.

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

200ng ADN khuôn

5 μ l 5x Dung dịch đệm phản ứng

0,25 μ l dNTP 20mM

0,7 μ l SHA130 (10pmol/l)

0,4 μ l SMP178 (10pmol/l)

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

Nước được bổ sung vào đến 25 μ l

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

4 phút ở 95°C

Tiếp theo: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp theo: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 30 chu kỳ

Tiếp theo: 10 phút ở 72°C

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

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

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

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

3. Sử dụng đoạn gắn đặc hiệu làm mẫu dò để phát hiện vật liệu mang EE-GM3

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

4. Quy trình xác định tình trạng hợp tử của EE-GM3 ở vật liệu cây đậu tương trên cơ sở PCR

4.1. Các đoạn mồi

Hai đoạn mồi nhận dạng trình tự nucleotit của locus kiểu hoang trước khi cài xen sự kiện ưu tú được thiết kế theo cách sao cho chúng được hướng đến nhau và có vị trí cài xen ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ nằm giữa chúng. Bộ đoạn mồi này, cùng với đoạn mồi thứ ba bổ sung của các trình tự ADN ngoại lai và hướng đến ADN bên sườn, cho phép khuếch đại đồng thời theo PCR trình tự đặc hiệu EE-GM3 cũng như trình tự kiểu hoang.

Đã thấy rằng các đoạn mồi sau cho kết quả rõ ràng và lặp lại được trong phản ứng PCR tính điểm trạng thái tiếp hợp giao tử đối với ADN của EE-GM3:

SMP187: 5'- ATA.TCA.ACC.CgT.AgC.TCg.AC-3' (SEQ ID NO. 6)

(đích: ADN thực vật kiểu hoang nằm trước trình tự bên sườn đầu 3')

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

(đích: ADN thực vật của trình tự bên sườn đầu 3')

STV019 5' - ggC.ATT.AAA.TTg.gTg.AAA.ATT.gC-3' (SEQ ID NO. 7)

(đích: ADN cài xen)

4.2. Các đoạn đã được khuếch đại

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

Đối với cặp đoạn mỗi SMP187 - SOY029: 319 cặp bazơ (locus kiểu hoang)

Đối với cặp đoạn mỗi STV019 - SOY029: 706 cặp bazơ (locus EE-GM3)

4.3. ADN khuôn

ADN khuôn được điều chế từ mẫu lá theo Edwards và các đồng tác giả (*Nucleic Acid Research*, 19, p1349, 1991). Khi sử dụng ADN điều chế được theo các phương pháp khác, cần tiến hành thử nghiệm bằng cách sử dụng lượng khuôn khác nhau. Thông thường, 25ng hoặc 50ng ADN khuôn hệ gen cho các kết quả tốt nhất.

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

Để tránh lỗi dương tính hoặc âm tính, các đối chứng dương tính và âm tính sau nên được đưa vào quá trình thực hiện PCR:

- Đối chứng hỗn hợp chính (đối chứng ADN âm tính). Đây là PCR trong đó ADN không được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Khi kết quả mong đợi quan sát được không phải là các sản phẩm PCR, thì kết quả này chỉ ra rằng hỗn hợp PCR không bị lẫn với ADN đích.

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

- Đối chứng ADN kiểu hoang. Đây là PCR trong đó ADN khuôn được cung cấp là ADN hệ gen được điều chế từ thực vật không chuyển gen. Kết quả mong đợi quan sát được không phải là khuếch đại sản phẩm PCR gen chuyển mà là khuếch đại sản

phẩm PCR nội sinh chỉ ra rằng gen chuyển không được khuếch đại nên ở mức độ phát hiện được trong mẫu ADN hệ gen.

4.5. Các điều kiện PCR

Các kết quả tối ưu thu được trong các điều kiện sau. Một cách hiển nhiên, các polymeraza Taq khác, như GO-Taq, có thể được sử dụng, và lúc đó các điều kiện có thể khác với đề xuất dưới đây của nhà cung cấp.

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

x μ l ADN khuôn (25ng)

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

0,5 μ l dNTP 10mM

0,5 μ l SMP187 (10pmol/ μ l)

0,5 μ l STV019 (10pmol/ μ l)

1 μ l SOY029 (10pmol/ μ l)

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

nước đến 25 μ l

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

4 phút ở 95°C

Tiếp theo: 1 phút ở 95°C

1 phút ở 57°C

2 phút ở 72°C

Trong 5 chu kỳ

Tiếp theo: 30 giây ở 92°C

30 giây ở 57°C

1 phút ở 72°C

Trong 25 chu kỳ

Tiếp theo: 10 phút ở 72°C

4.6. Phân tích gel agarosa

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

4.7. Xác minh kết quả

Dữ liệu của các mẫu ADN thực vật chuyển gen trong một lần thực hiện và một hỗn hợp chính để thực hiện PCR không được chấp nhận trừ khi:

- đối chứng dương tính thể hiện các sản phẩm PCR mong đợi (khuếch đại đích chuyển gen)
- đối chứng ADN dương tính kiểu hoang thể hiện kết quả mong đợi (khuếch đại đích kiểu hoang).
- đối chứng âm tính là âm tính đối với bước khuếch đại PCR (không đoạn nào).

Các đường thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR chuyển gen có kích thước mong đợi và không thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR kiểu hoang, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó khuôn ADN hệ gen được điều chế, là đồng hợp tử đối với catxet gen chuyển gen.

Các đường thể hiện lượng nhìn thấy được của các sản phẩm PCR chuyển gen và kiểu hoang với kích thước mong đợi, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN khuôn hệ gen đã được chuẩn bị, là bán hợp tử đối với catxet gen chuyển gen. Các đường không thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR chuyển gen và thể hiện lượng nhìn thấy được của sản phẩm PCR kiểu hoang, chỉ ra rằng cây tương ứng mà từ đó ADN khuôn hệ gen đã được chuẩn bị, không kế thừa trình tự chuyển gen đang được nghiên cứu và do đó là đồng hợp tử đối với locus kiểu hoang.

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

4.8. Áp dụng quy trình đánh giá trạng thái tiếp hợp giao tử để xác định trạng thái tiếp hợp giao tử ở các cây mang EE-GM3

Hình 3 minh họa kết quả thu được theo PCR đánh giá trạng thái tiếp hợp giao tử đối với EE-GM3 ở nhiều mẫu cây đậu tương. Các mẫu trên các đường 2 và 5 được thấy là chỉ chứa đoạn PCR (706 cặp bazơ) đặc trưng cho sự kiện ưu tú EE-GM3, trong khi các mẫu trên các đường 4, 6 và 7 chỉ chứa đoạn đặc trưng cho sự có mặt của locus kiểu hoang. Các đường 3, 8 và 9 chứa cả hai đoạn. Do đó, các đường 2 và 5 mang EE-GM3 ở dạng đồng hợp tử, các đường 3, 8 và 9 mang EE-GM3 ở dạng bán hợp tử và các đường 4, 6 và 7 chứa locus kiểu hoang ở dạng đồng hợp tử (đơn lẻ đối với EE-GM3). Đường 10 thể hiện mẫu đối chứng âm tính (nước), và các đường 1 và 11 thể hiện chất đánh dấu phân tử lượng (thang 100 cặp bazơ).

5. Nhập EE-GM3 vào các cây trồng được ưu tiên

Sự kiện ưu tú EE-GM3 được đưa vào bằng cách lai ngược lặp lại vào các cây đậu tương thương mại như, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây đậu tương 7631014 (US2009252860); cây đậu tương 7431014 (US2009252859); cây đậu tương 7925084 (US2009252858); cây đậu tương 7311153 (US2009252857); cây đậu tương S070159 (US2009252856); cây đậu tương 7535357 (US2009246353); cây đậu tương S070160 (US2009246352); cây đậu tương 26074414 (US2009249508); cây đậu tương 7509171 (US2009249507); cây đậu tương S070158 (US2009246351); cây đậu tương 7511319 (US2009249506); cây đậu tương 7113111 (US2009238945); cây đậu tương S06-02RM018047 (US7592518); cây đậu tương 7013345 (US2009232957); cây đậu tương 7041461 (US2009235376); cây đậu tương 7549450 (US2009232956); cây đậu tương 7317090 (US2009232955); cây đậu tương 2N2V58015 (US2009226597); cây đậu tương 7243182 (US2009226596); cây đậu tương 7143182 (US2009226595); cây đậu tương 7043182 (US2009220673); cây đậu tương S070157 (US2009222950); cây đậu tương 306924721 (US2009220672); cây đậu tương 7614385 (US2009220671); cây đậu tương 7925118 (US2009214750); cây đậu tương 7821295 (US2009214749); cây đậu tương 7811336 (US2009214748); cây đậu tương S070150 (US2009214747); cây đậu tương 6214260 (US2009214746); cây đậu tương S070152 (US2009214745); cây đậu tương 7429331 (US2009214751); cây đậu tương 26034631 (US2009208634); cây đậu tương S07-03JR 108674 (US7560621); cây đậu tương S07-03KL016279 (US7560620); cây đậu tương S06-CL959411 (US7554017); cây đậu tương

SG3870NRR (US2009158453); cây đậu tương HFPR-G (CA2645702); cây đậu tương S06-02JR423016 (US7521606); cây đậu tương S06-01JR119814 (US7518039); cây đậu tương S06-01JR119448 (US7518038); cây đậu tương 6540220 (US2009055960); cây đậu tương S060292 (US2009055959); cây đậu tương S050228 (US2009055958); cây đậu tương S06-02JR423003 (US7491873); cây đậu tương S06-02JR423005 (US7491872); cây đậu tương S06-02JR409114 (US7485782); cây đậu tương S06-SJ144056 (US7473823); cây đậu tương (US7470835); cây đậu tương 6910450 (US2008282369); cây đậu tương 6223012 (US7446246); cây đậu tương 6549250 (US7446245); cây đậu tương 17731225 (US2008271204); cây đậu tương 6928285 (US2008271203); cây đậu tương 6736054 (US2008271169); cây đậu tương S060299 (US2008271199); cây đậu tương S060294 (US2008271202); cây đậu tương 6943322 (US2008271201); cây đậu tương 5343260 (US2008263719); cây đậu tương 6439359 (US2008263704); cây đậu tương 6238359 (US2008263703); cây đậu tương 6547272 (US2008263702); cây đậu tương 6929431 (US2008263701); cây đậu tương 6703392 (US2008263700); cây đậu tương 6044483 (US2008263699); cây đậu tương S050224 (US2008263698); cây đậu tương 6719022 (US2008263697); cây đậu tương 5826056 (US2008263696); cây đậu tương 6265047 (US2008263724); cây đậu tương 6928331 (US2008263695); cây đậu tương 6719331 (US2008263694); cây đậu tương 6636454 (US2008263693); cây đậu tương 6226454 (US2008263718); cây đậu tương Q0073801 (US2008256657); cây đậu tương 6326393 (US2008256652); cây đậu tương 6408448 (US2008256651); cây đậu tương 6449315 (US2008250524); cây đậu tương S060296 (US2008250523); cây đậu tương 6012078 (US2008250522); cây đậu tương 6342078 (US2008250521); cây đậu tương 6419156 (US2008250520); cây đậu tương 5723264 (US2008250519); cây đậu tương S050225 (US2008250518); cây đậu tương S060298 (US2008244783); cây đậu tương 6935331 (US2008244782); cây đậu tương 6819456 (US2008244787); cây đậu tương S060297 (US2008244781); cây đậu tương 6135319 (US2008244786); cây đậu tương 6819331 (US2008244780); cây đậu tương 6137445 (US2008244779); cây đậu tương 6917445 (US2008244778); cây đậu tương 6111333 (US2008244777); cây đậu tương S050229 (US2008244776); cây đậu tương 6114011 (US2008244775); cây đậu tương 6900358 (US2008244784); cây đậu tương 6345184 (US2008244774); cây đậu tương 6836085 (US2008244773); cây đậu tương 6635047 (US2008244772); cây đậu tương 6139105 (US2008244771); cây đậu tương 6434385

(US2008244770); cây đậu tương S060295 (US2008244769); cây đậu tương 6035184 (US2008244768); cây đậu tương S060293 (US2008209590); cây đậu tương 6733322 (US2008209594); cây đậu tương 6421326 (US2008209593); cây đậu tương S060077 (US2008209589); cây đậu tương 6600375 (US2008209592); cây đậu tương S06-CL821457 (US7420104); cây đậu tương S07-02KG294306 (US7414178); cây đậu tương S06-BA046119 (US7414175); cây đậu tương S07-02KG294307 (US7411114); cây đậu tương SG3865N (US2008189802); cây đậu tương 6701475 (US7408097); cây đậu tương 1335025 (US2008178316); cây đậu tương 1686017 (US2008178315); cây đậu tương 2388028 (US2008178314); cây đậu tương 2387029 (US2008178313); cây đậu tương S06-WW152330 (US7388129); cây đậu tương 6424090 (US7385118); cây đậu tương 6723322 (US7385115); cây đậu tương SG4377NRR (US7385114); cây đậu tương S06-02JR111334 (US7381864); cây đậu tương 6141287 (US7378577); cây đậu tương MT110501 (US7378576); cây đậu tương (US7378575); cây đậu tương S06-WW169267 (US7375261); cây đậu tương 6223392 (US7371939); cây đậu tương S06-CL968413 (US7371937); cây đậu tương S06-CL951107 (US7368636); cây đậu tương S06-MT9152077 (US7361810); cây đậu tương 4211676 (US2008092253); cây đậu tương S06-M059029 (US7355101); cây đậu tương 6548193 (US7345228); cây đậu tương 6440261 (US7345227); cây đậu tương S060291 (US7342151); cây đậu tương S06-MT9206166 (US7339094); cây đậu tương S06-WW013107 (US7339093); cây đậu tương S06-M03256 (US7335820); cây đậu tương 6134466 (US7332656); cây đậu tương S06-01JR123373 (US7329800); cây đậu tương S06-MT9211059 (US7326831); cây đậu tương 26170838 (US2008016590); cây đậu tương 306612412 (US2008016588); cây đậu tương 26660135 (US2008016587); cây đậu tương 306734323 (US2008016586); cây đậu tương S06-01JR122235 (US7317144); cây đậu tương 5900450 (US7314986); cây đậu tương S06-MT116260 (US7314984); cây đậu tương S06-SJ143606 (US7312381); cây đậu tương S06-98181-G01-35167 (US7309819); cây đậu tương 26082635 (US7304219); cây đậu tương BA922834 (US7304217); cây đậu tương 01JR123480 (US7304216); cây đậu tương M061422 (US7304215); cây đậu tương 17082821 (US2007277262); cây đậu tương 17621620 (US2007277261); cây đậu tương 00977706 (US2007277260); cây đậu tương S060182 (US2007277259); cây đậu tương 26312034 (US7301078); cây đậu tương 26143837 (US7301077); cây đậu tương 435.TCS (US2007271626); cây đậu tương 495.RC

(US2007271625); cây đậu tương 5306230 (US7297845); cây đậu tương S06-WW167686 (US7291772); cây đậu tương 6141145 (US2007245426); cây đậu tương S050232 (US2007226829); cây đậu tương 5333301 (US2007226828); cây đậu tương S050215 (US2007226827); cây đậu tương 3235020 (US2007226826); cây đậu tương 5720482 (US2007226825); cây đậu tương S050216 (US2007226824); cây đậu tương 5512112 (US2007226823); cây đậu tương 3233021 (US2007226822); cây đậu tương 1336024 (US2007226821); cây đậu tương 5348287 (US2007226820); cây đậu tương 5204220 (US2007226819); cây đậu tương 6188027 (US2007226818); cây đậu tương 4183026 (US2007226817); cây đậu tương S06-WW157958 (US7271325); cây đậu tương 5733056 (US2007209091); cây đậu tương 90501911 (US2007209090); cây đậu tương S050221 (US2007204361); cây đậu tương 5802205 (US2007204360); cây đậu tương 1000642 (US2007204359); cây đậu tương 5420128 (US2007204358); cây đậu tương S050222 (US2007199094); cây đậu tương S050217 (US2007199093); cây đậu tương S050223 (US2007199092); cây đậu tương S050218 (US2007199091); cây đậu tương 5419227 (US2007199089); cây đậu tương 5319227 (US2007199088); cây đậu tương 5723045 (US2007199087); cây đậu tương 5051007 (US2007199086); cây đậu tương 5826175 (US2007192893); cây đậu tương S050231 (US2007192892); cây đậu tương 5826376 (US2007192891); cây đậu tương 5628386 (US2007192890); cây đậu tương 5138236 (US2007186307); cây đậu tương 5608398 (US2007186306); cây đậu tương S050230 (US2007186305); cây đậu tương 5624126 (US2007180561); cây đậu tương 5019225 (US2007180560); cây đậu tương 5549483 (US2007180559); cây đậu tương 4189010 (US2007180551); cây đậu tương 1486018 (US2007180550); cây đậu tương S050235 (US2007180549); cây đậu tương 5023230 (US2007180548); cây đậu tương S050238 (US2007174930); cây đậu tương 5830261 (US2007174928); cây đậu tương S050226 (US7247772); cây đậu tương 5806063 (US7247771); cây đậu tương S050233 (US7244881); cây đậu tương 5726085 (US7241939); cây đậu tương MT000792 (US7238867); cây đậu tương 5521161 (US7235718); cây đậu tương WW109447 (US7235717); cây đậu tương BA947474 (US7220898); cây đậu tương 5939002 (US7217870); cây đậu tương 5726175 (US7217869); cây đậu tương 5432082 (US7217868); cây đậu tương SG0850RR (US7211715); cây đậu tương SG1750NRR (US7208658); cây đậu tương MT017827 (US7208657); cây đậu tương 4N2V74028 (US7205458); cây đậu tương CL431203 (US7202400); cây đậu tương 4N0S63222

(US7199288); cây đậu tương 5520279 (US7196253); cây đậu tương 5834401 (US7196252); cây đậu tương 5621161 (US7196251); cây đậu tương CL722114 (US7196250); cây đậu tương 5741081 (US7193140); cây đậu tương CL727422 (US7186895); cây đậu tương 4N2V55022 (US7183468); cây đậu tương 5083011 (US7173169); cây đậu tương 5626085 (US7169976); cây đậu tương S050051 (US7169974); cây đậu tương 4506816 (US2006294626); cây đậu tương WW152201 (US7132594); cây đậu tương CL727636 (US7132593); cây đậu tương M08851 (US7126047); cây đậu tương 4324401 (US7105728); cây đậu tương S050164 (US7105727); cây đậu tương 4136015 (US2006195931); cây đậu tương 3133014 (US2006195930); cây đậu tương S040132 (US2006195929); cây đậu tương 4328386 (US2006195928); cây đậu tương 1339013 (US2006195927); cây đậu tương 4423183 (US2006195925); cây đậu tương S040131 (US2006195924); cây đậu tương 4929388 (US2006195923); cây đậu tương 4817034 (US2006195922); cây đậu tương 4916816 (US7098385); cây đậu tương 4713487 (US2006191032); cây đậu tương 4348019 (US2006191031); cây đậu tương S040122 (US2006191030); cây đậu tương S040133 (US2006185031); cây đậu tương CL821418 (US7091404); cây đậu tương 4441080 (US7091403); cây đậu tương 4805442 (US2006179509); cây đậu tương 4921237 (US2006179508); cây đậu tương 4417380 (US2006174369); cây đậu tương 4405070 (US2006174368); cây đậu tương 4417779 (US7084328); cây đậu tương S040125 (US2006168678); cây đậu tương 4909380 (US7081572); cây đậu tương S050162 (US7081571); cây đậu tương 6084016 (US7081570); cây đậu tương S050163 (US7078600); cây đậu tương S040135 (US7078598); cây đậu tương S040117 (US7078597); cây đậu tương M03393 (US7071391); cây đậu tương 4145306 (US7064253); cây đậu tương 900213 (US2006117405); cây đậu tương 1000126 (US2006117404); cây đậu tương 901023 (US2006117403); cây đậu tương S040130 (US7053280); cây đậu tương 4706198 (US7053279); cây đậu tương S040118 (US7053278); cây đậu tương S040119 (US7053277); cây đậu tương S040123 (US7053276); cây đậu tương 4442112 (US7049497); cây đậu tương 917013 (US7045689); cây đậu tương S040124 (US7045691); cây đậu tương 4238491 (US7045690); cây đậu tương S010136 (US7041882); cây đậu tương 900613 (US7030297); cây đậu tương 4337175 (US7030301); cây đậu tương S040121 (US7030300); cây đậu tương 4216033 (US7030299); cây đậu tương S040128

(US7022901); cây đậu tương S040120 (US7022900); cây đậu tương S040127 (US7019199); cây đậu tương S040134 (US7015378); cây đậu tương S040129 (US7015377); cây đậu tương 4513420 (US7005564); cây đậu tương 943013 (US2006031958); cây đậu tương S030136 (US2006021081); cây đậu tương 927013 (US2006021080); cây đậu tương 1000109 (US2006015962); cây đậu tương 90046112 (US2006010530); cây đậu tương 90897327 (US2006010529); cây đậu tương 90362421 (US2006010528); cây đậu tương 03022253 (US2006010527); cây đậu tương 02022433 (US2006010526); cây đậu tương 02022323 (US2006010525); cây đậu tương 02912951 (US2006010524); cây đậu tương 0102115 (US2006010523); cây đậu tương 915034 (US2006010522); cây đậu tương 0509255 (US2006010521); cây đậu tương 4803070 (US6982368); cây đậu tương 4704310 (US6979762); cây đậu tương SJ919784 (US2005268362); cây đậu tương CL615261 (US2005268361); đậu tương mới (US2004199964); cây đậu tương 0509214 (US2005210542); cây đậu tương 70826751 (US2005193442); cây đậu tương 0509243 (US2005193441); cây đậu tương 0509246 (US2005193440); cây đậu tương 0509253 (US2005193439); cây đậu tương 0509247 (US2005193438); cây đậu tương 0509252 (US2005193437); cây đậu tương 0509241 (US2005193436); cây đậu tương 0509249 (US6884927); cây đậu tương 0509244 (US2005183158); cây đậu tương 0509240 (US2005183157); cây đậu tương 0509239 (US2005183156); cây đậu tương 0509254 (US2005183155); cây đậu tương 0509245 (US2005183154); cây đậu tương 0509251 (US2005183153); cây đậu tương 4283008 (US6888050); cây đậu tương 2386009 (US2005183152); cây đậu tương 3282002 (US6870080); cây đậu tương 0509248 (US2005183151); cây đậu tương 5091007 (US6906249); cây đậu tương 0509236 (US2005166281); cây đậu tương 0509235 (US2005166280); cây đậu tương 0509237 (US2005166279); cây đậu tương SG5322NRR (US2005164390); cây đậu tương SG5030NRR (US2005166278); cây đậu tương SG4911NRR (US2005166277); cây đậu tương S030153 (US2005160504); cây đậu tương S030158 (US2005144680); cây đậu tương S030160 (US2005344679); cây đậu tương S030161 (US2005144678); cây đậu tương S030157 (US2005144677); cây đậu tương S030155 (US2005144676); cây đậu tương S030156 (US2005144675); cây đậu tương S030159 (US2005144674); cây đậu tương S030154 (US6900376); cây đậu tương S020030 (US2005114929); cây đậu tương S030010 (US2005114928); cây đậu tương SG1431RR (US2005097629); cây đậu tương SG1330NRR

(US2005097642); cây đậu tương S030150 (US2005071900); cây đậu tương S022209 (US2005050601); cây đậu tương S022217 (US2005050600); cây đậu tương S022219 (US2005050599); cây đậu tương S030151 (US2005050598); cây đậu tương 0491735 (US2005022272); cây đậu tương S022218 (US2005022271); cây đậu tương 6190006 (US2004268447); cây đậu tương SG1120RR (US2004250316); cây đậu tương 0487681 (US2004237153); cây đậu tương 0491717 (US2004237152); cây đậu tương SO22220 (US2004237151); cây đậu tương 0491715 (US2004237150); cây đậu tương 0491712 (US2004237149); cây đậu tương 0491718 (US2004237148); cây đậu tương 99271316 (US2004221344); cây đậu tương SO22212 (US2004221343); cây đậu tương 0491737 (US2004221342); cây đậu tương SO22211 (US2004221341); cây đậu tương SO22210 (US2004221340); cây đậu tương SO22213 (US2004221339); cây đậu tương 0491725 (US2004221346); cây đậu tương 03129016 (US2004221329); cây đậu tương SO22208 (US2004221328); cây đậu tương SO22207 (US2004221345); cây đậu tương 02932 (US2004210968); cây đậu tương 94137321 (US2004205862); cây đậu tương 94106224 (US2004205861); cây đậu tương 94143901 (US2004205859); cây đậu tương 0487685 (US2004205858); cây đậu tương 92440927 (US2004205857); cây đậu tương 0487686 (US2004205856); cây đậu tương SO22215 (US2004205855); cây đậu tương SO22214 (US2004205854); cây đậu tương 0491726 (US2004205849); cây đậu tương 92478609 (US2004205853); cây đậu tương 922013 (US6781040); cây đậu tương 0491727 (US2004205852); cây đậu tương 0491728 (US2004205851); cây đậu tương 1465003 (US2004098766); cây đậu tương 3186004 (US2004019936); cây đậu tương 7085005 (US2004205850); cây đậu tương SO22204 (US2004199958); cây đậu tương SO22206 (US2004199957); cây đậu tương 0491731 (US2004199956); cây đậu tương 0491733 (US2004199955); cây đậu tương 0491738 (US2004199954); cây đậu tương 0491732 (US2004199953); cây đậu tương 0491729 (US2004199952); cây đậu tương SO20011 (US2004199951); cây đậu tương 0491739 (US2004199950); cây đậu tương 0491730 (US2004199949); cây đậu tương 13873 (US2004199948); cây đậu tương 954011 (US2004181822); cây đậu tương 010022 (US2004181831); cây đậu tương 4181001 (US2003229926); cây đậu tương 0491721 (US2004168228); cây đậu tương 0491723 (US6911581); cây đậu tương 0491716 (US2004168226); cây đậu tương 0491713 (US2004168225); cây đậu tương 0491711 (US2004168224); cây đậu tương 0491722 (US2004168223); cây đậu tương 0491724 (US2004168222); cây đậu

tương 0491720 (US2004168221); cây đậu tương 0487682 (US2004168220); cây đậu
 tương 0491714 (US2004168219); cây đậu tương 0491719 (US2004168218); cây đậu
 tương DP 5634 RR (US2003177540); cây đậu tương S56-D7 (US2004098765); cây
 đậu tương 926877 (US2004064859); cây đậu tương SE73753 (US2004055059); cây
 đậu tương SN83594 (US2004055058); cây đậu tương SE71112 (US2004055056); cây
 đậu tương SE73090 (US2004055054); cây đậu tương SN79526 (US2004055053); cây
 đậu tương SW90702 (US2004055052); cây đậu tương SN79525 (US2004055051); cây
 đậu tương SE90345 (US2004055050); cây đậu tương 0149928 (US2004055049); cây
 đậu tương SN83780 (US2004055048); cây đậu tương 0053840 (US2004055047); cây
 đậu tương 924001 (US2004055046); cây đậu tương 0004747 (US2004055057); cây
 đậu tương 0037357 (US2004055045); cây đậu tương SN83366 (US2004055044); cây
 đậu tương SN76208 (US2004055043) cây đậu tương 0037370 (US2004055042); cây
 đậu tương SX95512 (US2004049821) cây đậu tương 0096008 (US2004049820); cây
 đậu tương SN83544 (US2004049819) cây đậu tương 0088401 (US2004049818); cây
 đậu tương SN64195 (US2004049817), cây đậu tương 0034754 (US2004049816); cây
 đậu tương SN71173 (US2004049815) cây đậu tương SN83211 (US2004049814); cây
 đậu tương 92422749 (US2004045058), cây đậu tương 0120311 (US2004045057); cây
 đậu tương S010344 (US2004003438); cây đậu tương 70876922 (US2004003437); cây
 đậu tương 924496 (US2004003436); cây đậu tương 19705120 (US2003237116); cây
 đậu tương 19704220 (US2003235914), cây đậu tương 19704280 (US2003237115);
 cây đậu tương 19704210 (US2003237114), cây đậu tương S37-N4 (US2003237113);
 cây đậu tương 19602310 (US2003233685); cây đậu tương 19704120
 (US2003233684); cây đậu tương 19704230 (US2003233683), cây đậu tương 1000126
 (US2003233682); cây đậu tương 93831526 (US2003221226); cây đậu tương 0322581
 (US2003221225); cây đậu tương 0332149 (US2003213028); cây đậu tương 0332144
 (US2003213027); cây đậu tương 924788 (US2003213026); cây đậu tương 924861
 (US2003213025); cây đậu tương 928070 (US2003213024); cây đậu tương S010354
 (US2003213023); cây đậu tương S010360 (US2003213022); cây đậu tương S010361
 (US2003213021); cây đậu tương S010363 (US2003213020); cây đậu tương S010364
 (US2003213019); cây đậu tương 0332148 (US2003208805); cây đậu tương 0332147
 (US2003208804); cây đậu tương 0332146 (US2003208803); cây đậu tương 0332135
 (US2003208802); cây đậu tương 1000144 (US2003208801); cây đậu tương 0332143

(US2003208800); cây đậu tương 0332145 (US2003208799); cây đậu tương S010345 (US2003204884); cây đậu tương 0332131 (US2003204883); cây đậu tương 0332130 (US2003204882); cây đậu tương 0332129 (US2003204881); cây đậu tương 0332122 (US2003204880); cây đậu tương S010350 (US2003204879); cây đậu tương S010355 (US2003204878); cây đậu tương 031766 (US2003204877); cây đậu tương S010353 (US2003204876); cây đậu tương 0322580 (US2003200579); cây đậu tương 0322579 (US2003200578); cây đậu tương S010347 (US2003200577); cây đậu tương S010349 (US2003200576); cây đậu tương 0332141 (US2003200575); cây đậu tương 0332142 (US2003200574); cây đậu tương 0332133 (US2003200573); cây đậu tương 0332134 (US2003200572); cây đậu tương 0332139 (US2003200571); cây đậu tương 0332137 (US2003200570); giống cây đậu tương XB33U08 (US7598435); giống cây đậu tương XB27D08 (US7592519); giống cây đậu tương XB41M08 (US7589261); giống cây đậu tương XB05J08 (US7589260); giống cây đậu tương XB33T08 (US7589259); giống cây đậu tương XB30Y08 (US7586025); giống cây đậu tương XB40U08 (US7582813); giống cây đậu tương XB29M08 (US7582811); giống cây đậu tương 93Y10 (US2009144843); giống cây đậu tương D4325666 (US2009055957); giống cây đậu tương D4125897 (US2009055956); giống cây đậu tương D4698573 (US2009055955); giống cây đậu tương D4356652 (US2009019592); giống cây đậu tương D4456885 (US2009019591); giống cây đậu tương D4698013 (US2009019590); giống cây đậu tương D4637114 (US2009019589); giống cây đậu tương D4102367 (US2009019595); giống cây đậu tương D4266582 (US2009019594); giống cây đậu tương D4422801 (US2009019593); giống cây đậu tương D4520980 (US2009019588); giống cây đậu tương D4521369 (US2009019587); giống cây đậu tương D4223057 (US2009019586); giống cây đậu tương D4682156 (US2009019585); giống cây đậu tương D4233569 (US2009019584); giống cây đậu tương D4925614 (US2009019583); giống cây đậu tương D4203144 (US2009019604); giống cây đậu tương D4102536 (US2009019582); giống cây đậu tương D4865324 (US2009019581); giống cây đậu tương D4825495 (US2009019580); giống cây đậu tương D4659251 (US2009019579); giống cây đậu tương D4258962 (US2009019578); giống cây đậu tương D4253969 (US2009019577); giống cây đậu tương D4696658 (US2009019603); giống cây đậu tương D4256925 (US2009019576); giống cây đậu tương D4253681 (US2009019575); giống cây đậu tương D4789254 (US2009019574); giống cây đậu tương D4713125

(US2009019573); giống cây đậu tương D4526223 (US2009019572); giống cây đậu tương D4556201 (US2009019571); giống cây đậu tương D4012368 (US2009019570); giống cây đậu tương D4452019 (US2009019569); giống cây đậu tương D4201483 (US2009019568); giống cây đậu tương D4463892 (US2009019567); giống cây đậu tương D4159630 (US2009019566); giống cây đậu tương D4470236 (US2009019565); giống cây đậu tương D4063284 (US2009019564); giống cây đậu tương D4021792 (US2009013429); giống cây đậu tương D4902530 (US2009013428); giống cây đậu tương D4367012 (US2009013427); giống cây đậu tương D4923560 (US2009013426); giống cây đậu tương D4253854 (US2009013425); giống cây đậu tương D4210110 (US2009007290); giống cây đậu tương D4523081 (US2009007289); giống cây đậu tương D4328762 (US2009007288); giống cây đậu tương D4483789 (US2009007287); giống cây đậu tương D4311702 (US2009007286); giống cây đậu tương D4127789 (US2008313765); giống cây đậu tương D4361423 (US2008313764); giống cây đậu tương D4208814 (US2008313763); giống cây đậu tương D4201139 (US2008313762); giống cây đậu tương D4120384 (US2008313761); giống cây đậu tương D4572906 (US2008313760); giống cây đậu tương D4301279 (US2008313759); giống cây đậu tương D4422957 (US2008313758); giống cây đậu tương D4256958 (US2008313757); giống cây đậu tương 4074328 (US2008282366); giống cây đậu tương XB47Q06 (US2008244767); giống cây đậu tương XB26R06 (US2008244766); giống cây đậu tương 4991629 (US2008216190); giống cây đậu tương 4158090 (US2008216189); giống cây đậu tương XB40K07 (US2008209582); giống cây đậu tương D0069201 (US2008178345); giống cây đậu tương D0064801 (US2008178320); giống cây đậu tương D0063801 (US2008178344); giống cây đậu tương D0061501 (US2008178343); giống cây đậu tương 4938051 (US2008178319); giống cây đậu tương 4880500 (US2008178318); giống cây đậu tương 4835953 (US2008178317); giống cây đậu tương 4684181 (US2008178342); giống cây đậu tương 4427363 (US2008178340); giống cây đậu tương 4676311 (US2008178339); giống cây đậu tương 4953710 (US2008178337); giống cây đậu tương 4857548 (US2008178336); giống cây đậu tương 4551757 (US2008178335); giống cây đậu tương 4027271 (US2008178334); giống cây đậu tương 4274171 (US2008178333); giống cây đậu tương 0341931 (US2008178332); giống cây đậu tương 4282159 (US2008178331); giống cây đậu tương 4852004 (US2008178330); giống cây đậu tương 4688589 (US2008178329);

giống cây đậu tương 4614131 (US2008178327); giống cây đậu tương 4201823 (US2008178326); giống cây đậu tương 92M22 (US2008178350); giống cây đậu tương 4174206 (US2008178322); giống cây đậu tương 4305498 (US2008178321); giống cây đậu tương 4423586 (US2008172761); giống cây đậu tương 4568207 (US2008172756); giống cây đậu tương 4840308 (US2008172755); giống cây đậu tương 4256323 (US2008172754); giống cây đậu tương 4789516 (US7399907); giống cây đậu tương 90Y40 (US2008168581); giống cây đậu tương 4959932 (US7396983); giống cây đậu tương 4062885 (US7394000); giống cây đậu tương 4858197 (US7390940); giống cây đậu tương 4092390 (US7390939); giống cây đậu tương 4735486 (US7390938); giống cây đậu tương 4219527 (US7388132); giống cây đậu tương 4599695 (US7388131); giống cây đậu tương 4554257 (US7388130); giống cây đậu tương 4896902 (US7385113); giống cây đậu tương 4367308 (US7385112); giống cây đậu tương 4589609 (US7385111); giống cây đậu tương 4640250 (US7385110); giống cây đậu tương 4540394 (US7385109); giống cây đậu tương 4297661 (US7385108); giống cây đậu tương 4958786 (US7381866); giống cây đậu tương 4440685 (US7375262); giống cây đậu tương 4008211 (US7371938); giống cây đậu tương 4778469 (US7368637); giống cây đậu tương 4766295 (US7355103); giống cây đậu tương 4436909 (US7355102); giống cây đậu tương 4812469 (US7351886); giống cây đậu tương 4761767 (US7351885); giống cây đậu tương 4142393 (US7329801); giống cây đậu tương 4502135 (US7326832); giống cây đậu tương 4353363 (US7321082); giống cây đậu tương 91B42 (US7317143); giống cây đậu tương 0330739 (US2007271622); giống cây đậu tương 0384279 (US7294768); giống cây đậu tương 4175567 (US2007256187); giống cây đậu tương 4336643 (US2007256186); giống cây đậu tương 4671685 (US2007256185); giống cây đậu tương 4309194 (US2007256190); giống cây đậu tương 0330738 (US2007256184); giống cây đậu tương 0045477 (US2007256183); giống cây đậu tương 0437973 (US2007256182); giống cây đậu tương 0457028 (US2007256181); giống cây đậu tương 0367478 (US2007256180); giống cây đậu tương 0358232 (US2007256179); giống cây đậu tương 0417158 (US2007256178); giống cây đậu tương 4559809 (US2007256177); giống cây đậu tương 0196172 (US2007256176); giống cây đậu tương 4785923 (US2007256175); giống cây đậu tương 4587513 (US2007256174); giống cây đậu tương 0409670 (US2007256173); giống cây đậu tương 4010165

(US2007256172); giống cây đậu tương 0421133 (US2007256171); giống cây đậu tương 0240187 (US2007256170); giống cây đậu tương 0387907 (US2007256169); giống cây đậu tương 0232405 (US2007256168); giống cây đậu tương 0146529 (US2007256167); giống cây đậu tương 4788561 (US2007256166); giống cây đậu tương 457114 (US2007256165); giống cây đậu tương 0149217 (US2007256164); giống cây đậu tương 4247825 (US2007254366); giống cây đậu tương 0212938 (US2007256163); giống cây đậu tương 0146565 (US2007256162); giống cây đậu tương 4647672 (US2007256161); giống cây đậu tương 0215818 (US2007256160); giống cây đậu tương 0384531 (US2007256159); giống cây đậu tương 4878185 (US2007254365); giống cây đậu tương 4498438 (US2007256158); giống cây đậu tương 0436052 (US2007256157); giống cây đậu tương 4782157 (US2007256156); giống cây đậu tương 0385457 (US2007256155); giống cây đậu tương 0385240 (US2007256154); giống cây đậu tương 4735316 (US2007256153); giống cây đậu tương 0277524 (US2007256152); giống cây đậu tương 0276951 (US2007256151); giống cây đậu tương XB37L07 (US2007245429); giống cây đậu tương XB35X07 (US2007226837); giống cây đậu tương XB35S07 (US2007226836); giống cây đậu tương XB35F07 (US2007226835); giống cây đậu tương XB34R07 (US2007226834); giống cây đậu tương XB34L07 (US2007226833); giống cây đậu tương XB34D07 (US2007226832); giống cây đậu tương XB33G07 (US2007226831); giống cây đậu tương 98Y11 (US2007169220); giống cây đậu tương 0137335 (US7241941); giống cây đậu tương XB15E07 (US2007150980); giống cây đậu tương 92M52 (US2007150979); giống cây đậu tương XB47R07 (US2007136888); giống cây đậu tương XB46V07 (US2007136887); giống cây đậu tương XB57E07 (US2007136886); giống cây đậu tương XB54X07 (US2007136885); giống cây đậu tương XB54V07 (US2007136884); giống cây đậu tương XB52Q07 (US2007136883); giống cây đậu tương XB37M07 (US2007136882); giống cây đậu tương XB37J07 (US2007136881); giống cây đậu tương XB34Q07 (US2007136880); giống cây đậu tương XB32S07 (US2007136879); giống cây đậu tương XB32J07 (US2007136878); giống cây đậu tương XB31R07 (US2007136877); giống cây đậu tương XB31J07 (US2007136876); giống cây đậu tương XB29K07 (US2007136875); giống cây đậu tương XB31H07 (US2007136874); giống cây đậu tương XB30G07 (US2007136873); giống cây đậu tương XB30E07 (US2007136872); giống cây đậu tương XB25E07 (US2007136871);

giống cây đậu tương XB26X07 (US2007136870); giống cây đậu tương XB23L07 (US2007136869); giống cây đậu tương XB19Z07 (US2007136868); giống cây đậu tương XB19E07 (US2007136867); giống cây đậu tương XB18M07 (US2007136866); giống cây đậu tương XB18K07 (US2007136865); giống cây đậu tương XB18J07 (US2007136864); giống cây đậu tương XB17W07 (US2007136863); giống cây đậu tương XB17U07 (US2007136862); giống cây đậu tương XB15B07 (US2007136861); giống cây đậu tương XB12R07 (US2007136860); giống cây đậu tương XB11J07 (US2007136859); giống cây đậu tương XB04E07 (US2007136858); giống cây đậu tương XB02K07 (US2007136857); giống cây đậu tương XB49V07 (US2007136856); giống cây đậu tương XB48X07 (US2007136855); giống cây đậu tương 92M75 (US2007136854); giống cây đậu tương XB48W07 (US2007136853); giống cây đậu tương XB44G07 (US2007136852); giống cây đậu tương XB42K07 (US2007136851); giống cây đậu tương XB42H07 (US2007136850); giống cây đậu tương XB41J07 (US2007136849); giống cây đậu tương XB40Y07 (US2007136848); giống cây đậu tương XB40X07 (US2007136847); giống cây đậu tương XB39E07 (US2007136846); giống cây đậu tương XB38W07 (US2007136845); giống cây đậu tương XB38S07 (US2007136844); giống cây đậu tương XB23V07 (US2007136843); giống cây đậu tương XB31M07 (US2007130652); giống cây đậu tương XB28E07 (US2007130651); giống cây đậu tương XB25S07 (US2007130650); giống cây đậu tương XB21N07 (US2007130649); giống cây đậu tương XB03Q07 (US2007130648); giống cây đậu tương XB49Q07 (US2007130647); giống cây đậu tương XB06M07 (US2007130646); giống cây đậu tương S04-97130-15-02 (US7196249); giống cây đậu tương S04-97026-N99-42648-01 (US7189896); giống cây đậu tương S05-97016-G99-21212 (US7186894); giống cây đậu tương S05-99048-19 (US7164064); giống cây đậu tương 92B14 (US7161065); giống cây đậu tương 98R31 (US2007006350); giống cây đậu tương S05-97177-N00-22972 (US7132592); giống cây đậu tương XB25G06 (US2006225160); giống cây đậu tương 91M70 (US2006174381); giống cây đậu tương XB24R06 (US2006162029); giống cây đậu tương S03-95368-N98-52902 (US7078594); giống cây đậu tương S05-97130-51 (US7078599); giống cây đậu tương XB11L06 (US2006130187); giống cây đậu tương 94B13 (US7064251); giống cây đậu tương 94B74 (US7064250); giống cây đậu tương XB27J06 (US2006112462); giống cây đậu tương XB29N06 (US2006112460); giống cây đậu tương XB28T06

(US2006112459); giống cây đậu tương XB16W06 (US2006112458); giống cây đậu tương XB18C06 (US2006112456); giống cây đậu tương XB 10M06 (US2006107391); giống cây đậu tương XB06K06 (US2006107390); giống cây đậu tương XB28V06 (US2006107389); giống cây đậu tương XB004A06 (US2006107388); giống cây đậu tương XB12L06 (US2006107387); giống cây đậu tương XB005A06 (US2006107386); giống cây đậu tương XB25H06 (US2006107385); giống cây đậu tương XB39W06 (US2006107384); giống cây đậu tương XB27K06 (US2006107383); giống cây đậu tương XB29R06 (US2006107382); giống cây đậu tương XB16S06 (US2006107381); giống cây đậu tương XB36V06 (US2006107380); giống cây đậu tương XB07N06 (US2006107379); giống cây đậu tương XB23H06 (US2006107378); giống cây đậu tương XB35C06 (US2006107377); giống cây đậu tương XB32L06 (US2006107376); giống cây đậu tương XB58P06 (US2006107375); giống cây đậu tương XB36M06 (US2006107374); giống cây đậu tương XB22G06 (US2006107373); giống cây đậu tương XB36Q06 (US2006107372); giống cây đậu tương 91M61 (US2006107371); giống cây đậu tương XB32A06 (US2006107370); giống cây đậu tương XB19V06 (US2006107369); giống cây đậu tương XB43C06 (US2006107368); giống cây đậu tương XB22N06 (US2006107367); giống cây đậu tương XB38E06 (US2006107366); giống cây đậu tương XB37U06 (US2006107365); giống cây đậu tương XB37Q06 (US2006107364); giống cây đậu tương XB00D06 (US2006107363); giống cây đậu tương XB14N06 (US2006107362); giống cây đậu tương XB31H06 (US2006107361); giống cây đậu tương XB21Z06 (US2006107360); giống cây đậu tương XB005B06 (US2006107359); giống cây đậu tương XB15W06 (US2006107358); giống cây đậu tương XB33N06 (US2006107357); giống cây đậu tương XB 18W06 (US2006107356); giống cây đậu tương XB32M06 (US2006107355); giống cây đậu tương XB19F06 (US2006107354); giống cây đậu tương S03-95021-55-138-AB (US7026531); giống cây đậu tương 94M41 (US7002061); giống cây đậu tương 91M50 (US6998518); giống cây đậu tương 92B13 (US6989475); giống cây đậu tương 93B68 (US6989474); giống cây đậu tương 93B09 (US6979759); giống cây đậu tương 92M00 (US6972352); giống cây đậu tương XB08P05 (US2005120433); giống cây đậu tương XB26V05 (US2005150023); giống cây đậu tương XB21R05 (US2005108795); giống cây đậu tương XB28E05 (US2005114942); giống cây đậu tương XB58K05 (US2005114941); giống cây đậu tương XB27B05 (US2005114940); giống cây đậu

tương XB21S05 (US2005150022); giống cây đậu tương XB26U05 (US2005138695);
 giống cây đậu tương XB35K05 (US2005150021); giống cây đậu tương XB18S05
 (US2005120436); giống cây đậu tương XB25C05 (US2005120435); giống cây đậu
 tương 90M01 (US2005120434); giống cây đậu tương XB22H05 (US2005150020);
 giống cây đậu tương XB22K05 (US2005114939); giống cây đậu tương XB58G05
 (US2005114938); giống cây đậu tương XB57U05 (US2005120432); giống cây đậu
 tương XB49M05 (US2005120431); giống cây đậu tương XB20D05 (US2005144683);
 giống cây đậu tương XB41B05 (US2005150019); giống cây đậu tương XB38T05
 (US2005120430); giống cây đậu tương XB13T05 (US2005120429); giống cây đậu
 tương XB19Y05 (US2005120428); giống cây đậu tương XB43D05 (US2005120427);
 giống cây đậu tương XB40E05 (US2005120426); giống cây đậu tương XB39N05
 (US2005120425); giống cây đậu tương 93M01 (US2005120424); giống cây đậu tương
 XB31W05 (US2005223439); giống cây đậu tương XB32C05 (US2005114937); giống
 cây đậu tương XB40D05 (US2005120423); giống cây đậu tương 92M61
 (US2005120422); giống cây đậu tương 91M91 (US2005114936); giống cây đậu tương
 XB33Y05 (US2005120421); giống cây đậu tương XB34A05 (US2005120420); giống
 cây đậu tương XB13U05 (US2005114935); giống cây đậu tương XB12K05
 (US2005114934); giống cây đậu tương XB30P05 (US2005120419); giống cây đậu
 tương XB57T05 (US2005114933); giống cây đậu tương XB17S05 (US2005114932);
 giống cây đậu tương XB25Y05 (US2005114930); giống cây đậu tương XB25S05
 (US2005150017); giống cây đậu tương XB43W04 (US2004177420); giống cây đậu
 tương XB44W04 (US2004177419); giống cây đậu tương XB53J04 (US2004199960);
 giống cây đậu tương XB43V04 (US2004216192); giống cây đậu tương XB49K04
 (US2004172668); giống cây đậu tương XB27P04 (US2004205864); giống cây đậu
 tương XB29L04 (US2004177418); giống cây đậu tương XB29K04 (US2004177417);
 giống cây đậu tương XB41U04 (US2004231017); giống cây đậu tương XB34D04
 (US2004177416); giống cây đậu tương XB09J04 (US2004172711); giống cây đậu
 tương XB32Y04 (US2004194169); giống cây đậu tương XB44D04 (US2004172710);
 giống cây đậu tương XB44C04 (US2004172709); giống cây đậu tương XB10L04
 (US2004172708); giống cây đậu tương XB19U04 (US2004172707); giống cây đậu
 tương XB02F04 (US2004172706); giống cây đậu tương XB25X04 (US2004172705);
 giống cây đậu tương XB26L04 (US2004172704); giống cây đậu tương XB11F04

(US2004172703); giống cây đậu tương XB40Z04 (US2004177415); giống cây đậu tương XB40Y04 (US2004181833); giống cây đậu tương XB007C04 (US2004181832); giống cây đậu tương 96M20 (US2004172702); giống cây đậu tương XB39J04 (US2004172701); giống cây đậu tương XB29A04 (US2004172700); giống cây đậu tương XB35P04 (US2004172699); giống cây đậu tương XB58Z04 (US2004177414); giống cây đậu tương XB43R04 (US2004372698); giống cây đậu tương XB35L04 (US2004172697); giống cây đậu tương XB06H04 (US2004172696); giống cây đậu tương XB59U04 (US2004172695); giống cây đậu tương XB64C04 (US2004172694); giống cây đậu tương 95M80 (US2004172693); giống cây đậu tương XB35Q04 (US2004177413); giống cây đậu tương XB04D04 (US2004177412); giống cây đậu tương XB08L04 (US2004177411); giống cây đậu tương XB18Q04 (US2004177410); giống cây đậu tương XB16Q04 (US2004177409); giống cây đậu tương XB55K04 (US2004172692); giống cây đậu tương XB57M04 (US2004172691); giống cây đậu tương XB25L04 (US2004205863); giống cây đậu tương XB48T04 (US2004194168); giống cây đậu tương XB42X04 (US2004199959); giống cây đậu tương XB31T04 (US2004177408); giống cây đậu tương XB31U04 (US2004194167); giống cây đậu tương XB30E04 (US2004177407); giống cây đậu tương XB31R04 (US2004177406); giống cây đậu tương S03-95341-A98-60618 (US6909033); giống cây đậu tương SN97-6946 (US2004168227); giống cây đậu tương 94M70 (US6864408); giống cây đậu tương 92M70 (US6797866); giống cây đậu tương 92M71 (US6858782); giống cây đậu tương 91M40 (US6828490); giống cây đậu tương 93M80 (US6849789); giống cây đậu tương XB39N03 (US6864407); giống cây đậu tương 93M90 (US6846975); giống cây đậu tương 90M90 (US6852913); giống cây đậu tương 92M72 (US6960708); giống cây đậu tương 91M90 (US6849788); giống cây đậu tương 92M50 (US6855876); giống cây đậu tương 92M30 (US6951974); giống cây đậu tương 93M60 (US6797865); giống cây đậu tương 93M40 (US6791016); giống cây đậu tương 93M41 (US6835875); giống cây đậu tương XB15P03 (US6797864); giống cây đậu tương XB24H03 (US6936752); giống cây đậu tương XB05A03 (US6815585); giống cây đậu tương 92M80 (US6849787); giống cây đậu tương XB33S03 (US6855875); giống cây đậu tương XB48P03 (US6797863); giống cây đậu tương XB29X03 (US6806406); giống cây đậu tương XB02C03 (US6800795); giống cây đậu tương XB29W03 (US6858781); giống cây

đậu tương 91M10 (US6958437); giống cây đậu tương 92M10 (US6916975); giống cây đậu tương XB10G03 (US6806405); giống cây đậu tương 92M31 (US6846974); giống cây đậu tương XB38D03 (US6806404); giống cây đậu tương XB34N03 (US6803508); giống cây đậu tương XB30W03 (US6809236); giống cây đậu tương XB37J03 (US6844488); giống cây đậu tương SE72581 (US2004148665); giống cây đậu tương SE90076 (US2004148664); giống cây đậu tương SD82997 (US2004148663); giống cây đậu tương 0037393 (US2004148662); giống cây đậu tương 0088414 (US2004148661); giống cây đậu tương 0149926 (US2004148660); giống cây đậu tương 0037209 (US2004148659); giống cây đậu tương 93B36 (US6833498); giống cây đậu tương 90B74 (US6812384); giống cây đậu tương 90B51 (US6818809); giống cây đậu tương 91B03 (US6815584); giống cây đậu tương 95B43 (US6818808); giống cây đậu tương 95B42 (US6815583); giống cây đậu tương 92B47 (US6812383); giống cây đậu tương SE90346 (US2004055055); giống cây đậu tương 0007583 (US2004010824); giống cây đậu tương 0008079 (US2004010823); giống cây đậu tương S02-AP98041-2-333-01 (US2003121076); giống cây đậu tương S02-98041-2-251-01 (US2003182694); giống cây đậu tương S02-AP98041-2-262-02 (US2003196220); giống cây đậu tương S02-95021-55-240-BA (US2003188348); giống cây đậu tương APA94-31572 (US2003061641); giống cây đậu tương AP98041-1-203 (US2003056251); giống cây đậu tương APA95-15294 (US2003061640); giống cây đậu tương AP98041-4-117 (US2003056250); giống cây đậu tương 91B33 (US6580018); giống cây đậu tương 93B85 (US6605762); giống cây đậu tương 92B76 (US6610911); giống cây đậu tương 92B38 (US6605761); giống cây đậu tương 94B24 (US6613967); giống cây đậu tương 94B73 (US6605760); giống cây đậu tương 93B86 (US6610910); giống cây đậu tương 91B12 (US6583343); giống cây đậu tương 95B34 (US6605759); giống cây đậu tương 94B23 (US6605758); giống cây đậu tương 90B11 (US6583342); giống cây đậu tương 91B92 (US6586659); giống cây đậu tương 95B96 (US6605757); giống cây đậu tương 93B72 (US6566589); giống cây đậu tương 95B97 (US6613966); giống cây đậu tương 92B95 (US6608243); giống cây đậu tương 93B47 (US6583341); giống cây đậu tương 97B52 (US6605756); giống cây đậu tương 93B15 (US6617499); giống cây đậu tương 94B54 (US6613965); giống cây đậu tương 93B67 (US6573433); giống cây đậu tương 93B87 (US6727410); giống cây đậu tương 96B51 (US6613964); giống cây đậu tương 92B84 (US6730829); giống cây đậu tương 92B12

(US6605755); giống cây đậu tương 90A07 (US6320105); giống cây đậu tương 93B26 (US6342659); giống cây đậu tương 96B21 (US6369301); giống cây đậu tương 92B63 (US6326529); giống cây đậu tương 93B46 (US6323402); giống cây đậu tương 92B75 (US6362400); giống cây đậu tương 93B08 (US6323401); giống cây đậu tương 97B62 (US6323400); giống cây đậu tương 92B37 (US6323399); giống cây đậu tương 92B56 (US6339186); giống cây đậu tương 93B66 (US6307131); giống cây đậu tương 92B62 (US6346657); giống cây đậu tương 92B36 (US6369300); giống cây đậu tương 90B73 (US6316700); giống cây đậu tương 95B95 (US6323398); giống cây đậu tương 93B65 (US6229074); giống cây đậu tương 92B24 (US6284950); giống cây đậu tương 94B53 (US6235976); giống cây đậu tương 94B22 (US6140557); giống cây đậu tương 93B84 (US6143956); giống cây đậu tương 95B32 (US6229073); giống cây đậu tương 95B53 (US6147283); giống cây đậu tương 93B35 (US6153816); giống cây đậu tương 93B07 (US6143955); giống cây đậu tương 92B74 (US6124526); giống cây đậu tương 92B35 (US6166296); giống cây đậu tương 94B45 (US6162968); giống cây đậu tương 96B01 (US6143954); giống cây đậu tương 93B53 (US6335197).

Quan sát thấy rằng việc nhập sự kiện ưu tú vào các cây này không ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính kiểu hình hoặc đặc tính nông học mong đợi bất kỳ của các cây này (không làm giảm sản lượng) trong khi sự biểu hiện của gen chuyển, như được xác định bởi khả năng chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, đạt được mức độ chấp nhận được về mặt thương mại. Đặc tính này xác nhận trạng thái của gen EE-GM3 là sự kiện ưu tú.

Tốt hơn nữa, nếu sự kiện ưu tú EE-GM3 kết hợp với một hoặc nhiều sự kiện khác của đậu tương có bán trên thị trường, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các sự kiện khác truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ, như các sự kiện đã được bộc lộ trong các hồ sơ DA-APHIS: 09-349-01p, 09-201-01p, 09-183-01p, 09-082-01p, 09-015-01p, 06-354-01p, 06-271-01p, 06-178-01p, 98-238-01p, 98-014-01p, 97-008-01p, 96-068-01p, 95-335-01p, 93-258-01p (ví dụ, xem www.aphis.usda.gov/brs/notjeg.html), hoặc sự kiện MON89788 (truyền tính trạng chịu được glyphosat) đã được bộc lộ trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006-282915, sự kiện DP-305423-1 (truyền tính trạng chịu được axit oleic bậc cao/chất ức chế ALS) đã được bộc lộ trong WO2008/054747, các gen A2704-12 và A5547-127 (truyền tính trạng chịu được glufosinat) đã lần lượt được bộc lộ trong

WO2006/108674 hoặc WO2006/108675, MON87701 đã được bộc lộ trong US2009130071, sự kiện 3560.4.3.5 đã được bộc lộ trong US2009036308, sự kiện DP-305423-1 đã được bộc lộ trong US2008312082, hoặc sự kiện BPS-CV127-9 (sự kiện 127) đã được bộc lộ trong WO 2010/080829.

Thuật ngữ "cây" hoặc "thực vật" được sử dụng trong các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây, trừ khi có quy định khác, nhằm bao hàm cả mô thực vật, ở giai đoạn phát triển bất kỳ, cũng như tế bào, mô hoặc cơ quan bất kỳ lấy từ hoặc thu được từ cây bất kỳ như vậy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt, lá, thân, hoa, rễ, tế bào đơn, giao tử, dịch nuôi cấy tế bào, dịch nuôi cấy mô hoặc thể nguyên sinh bất kỳ.

Hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 được nộp lưu tại NCIMB (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB9YA, Scotland) với số nộp lưu 32-RRMM-0531 vào ngày 12/10/2009, với số nộp lưu của NCIMB là NCIMB 41659, và sức sống của nó đã được xác nhận. Tên gọi khác cho EE-GM3 là sự kiện FG-072, hoặc sự kiện MST-FG072-3.

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

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện các thay đổi hoặc biến đổi khác nhau đối với các phương án đã được bộc lộ. Các thay đổi hoặc biến đổi này là không vượt quá nguyên lý hoặc phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.
2. Cây đậu tương chuyển gen theo điểm 1, trong đó ADN hệ gen của cây đậu tương này, khi được phân tích bằng PCR với hai đoạn mỗi lần lượt chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5, tạo ra đoạn ADN có khoảng 263 cặp bazơ.
3. Hạt đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.
4. Hạt đậu tương chuyển gen theo điểm 3, trong đó ADN hệ gen của hạt đậu tương này, khi được phân tích bằng PCR với hai đoạn mỗi lần lượt chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5, tạo ra đoạn ADN có khoảng 263 cặp bazơ.
5. Bộ phận của cây đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.
6. Bộ phận của cây đậu tương chuyển gen theo điểm 5, trong đó ADN hệ gen của nó, khi được phân tích bằng PCR với hai đoạn mỗi lần lượt chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 4 và SEQ ID NO. 5, tạo ra đoạn ADN có khoảng 263 cặp bazơ.
7. Hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659 hoặc hạt con cháu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 có thể thu được từ hạt này.
8. Cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 có thể thu được từ hạt theo điểm 7.
9. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó hạt này có thể được tạo ra bằng cách nhân giống và/hoặc gây giống với cây đậu tương được phát triển từ hạt đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.
10. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó hạt quy chiếu mang sự kiện này đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

11. Cây đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó cây này có thể thu được từ hạt theo điểm 10.
12. Phương pháp tạo ra cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương theo điểm 1 với cây đậu tương khác, và trồng hạt thu được từ bước lai chéo nêu trên.
13. ADN hệ gen của cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 theo điểm 1.
14. Cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm theo thứ tự các trình tự nucleotit sau: a) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến 1451; b) trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 6760 đến nucleotit 6958; c) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 6874 đến nucleotit 7298; d) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 7 đến nucleotit 7291; e) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 12 đến nucleotit 7265; f) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 217 đến nucleotit 240; và g) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408.
15. Cây đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1441 đến nucleotit 1462 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.
16. Cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 2 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 3, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.
17. Cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.
18. Cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

19. Cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic chứa phần bổ sung của nó.
20. Hạt đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1441 đến nucleotit 1462 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.
21. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 2 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 3, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.
22. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 và trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.
23. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.
24. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 trong hệ gen của nó, trong đó sự kiện này bao gồm trình tự axit nucleic chứa phần bổ sung của nó.
25. Phương pháp tạo ra hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương theo điểm 2 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.
26. Phương pháp tạo ra hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương theo điểm 8 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.
27. Phương pháp tạo ra hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây phát triển từ hạt theo điểm 9 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.
28. Phương pháp tạo ra cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương theo điểm 11 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.

29. Phương pháp tạo ra hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương theo điểm 15 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.

30. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt theo điểm 3, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

31. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt thu được từ cây đậu tương theo điểm 8, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

32. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt theo điểm 9, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

33. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt theo điểm 20, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

34. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt theo điểm 23, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

35. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa sự kiện ưu tú EE-GM3 nêu trong điểm 1 vào hệ gen của cây đậu tương này, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

36. Phương pháp theo điểm 35, trong đó bước đưa vào này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

37. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3

theo điểm 8, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

38. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 được trồng từ hạt theo điểm 9, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

39. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 theo điểm 14, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

40. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 theo điểm 18, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

41. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa sự kiện ưu tú EE-GM3 nêu trong điểm 18 vào hệ gen của cây đậu tương này, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

42. Phương pháp theo điểm 41, trong đó bước đưa vào này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

43. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 theo điểm 16, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

44. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3 theo điểm 17, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

45. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương theo điểm 18, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

46. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương thứ nhất không mang sự kiện ưu tú EE-GM3 với cây đậu tương theo điểm 19, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

47. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng bằng một lượng hiệu quả của thuốc diệt cỏ gốc isoxaflutol, trong đó cây đậu tương này chịu được thuốc diệt cỏ gốc isoxaflutol này.

48. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trước khi trồng cây đậu tương này hoặc gieo hạt, sau đó trồng hoặc gieo đậu tương trên cánh đồng đã được xử lý trước này.

49. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng hạt đậu tương theo điểm 3, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng, trong đó hạt này được gieo, bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trước khi cây đậu tương nảy mầm, nhưng sau khi đã gieo hạt.

50. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cây này bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trên ngọn cây đậu tương, bước xử lý này có thể là đồng thời, sau hoặc trước khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ sau khi nảy mầm là glyphosat trên ngọn cây.

51. Hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

52. Phương pháp tạo ra hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây được trồng từ hạt theo điểm 51 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.

53. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt theo điểm 51, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

54. Phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó phương pháp này bao gồm bước đưa sự kiện ưu tú EE-GM3 nêu trong điểm 51 vào hệ gen của cây đậu tương này, và lựa chọn cây con chịu được glyphosat và/hoặc isoxaflutol, trong đó cây con này mang sự kiện ưu tú EE-GM3.

55. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương được trồng từ hạt theo điểm 51, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng bằng một lượng hiệu quả của thuốc diệt cỏ gốc isoxaflutol, trong đó cây đậu tương này chịu được thuốc diệt cỏ gốc isoxaflutol này.

56. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng hạt đậu tương theo điểm 51, bao gồm bước xử lý cánh đồng bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trước khi gieo hạt đậu tương này, sau đó gieo hạt đậu tương trên cánh đồng đã được xử lý trước này.

57. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng hạt đậu tương theo điểm 51, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng, trong đó hạt này được gieo, bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trước khi cây đậu tương nảy mầm nhưng sau khi đã gieo hạt.

58. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương được trồng từ hạt theo điểm 51, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cây này bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trên ngọn cây đậu tương, bước xử lý này có thể là đồng thời, sau hoặc trước khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ sau khi nảy mầm là glyphosat trên ngọn cây.

59. Phương pháp tạo ra hạt đậu tương mang sự kiện ưu tú EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai chéo cây đậu tương theo điểm 18 với cây đậu tương khác, và trồng hạt mang sự kiện ưu tú EE-GM3 thu được từ bước lai chéo nêu trên.

60. Sản phẩm đậu tương thu được từ hạt theo điểm 21, trong đó sản phẩm đậu tương này mang sự kiện ưu tú EE-GM3 và là khô đậu tương, hạt nghiền vỡ, bột đậu tương, hoặc bông đậu tương.

61. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương theo điểm 16 hoặc hạt đậu tương theo điểm 21, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trước khi trồng cây đậu tương này hoặc gieo hạt, sau đó trồng hoặc gieo đậu tương trên cánh đồng đã được xử lý trước này.

62. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng hạt đậu tương theo điểm 21, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cánh đồng, trong đó hạt này được gieo, bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trước khi cây đậu tương nảy mầm, nhưng sau khi đã gieo hạt.

63. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên cánh đồng trồng cây đậu tương theo điểm 16, trong đó phương pháp này bao gồm bước xử lý cây này bằng thuốc diệt cỏ là chất ức chế HPPD trên ngọn cây đậu tương, bước xử lý này có thể là đồng thời, sau hoặc trước khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ sau nảy mầm là glyphosat trên ngọn cây.

64. Phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 11 hoặc phần bổ sung của nó.

65. Phân tử ADN chứa theo thứ tự các trình tự nucleotit sau: a) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 từ nucleotit 1 đến 1451; b) trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 6760 đến nucleotit 6958; c) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 từ nucleotit 6874 đến nucleotit 7298; d) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 từ nucleotit 7 đến nucleotit 7291; e) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 từ nucleotit 12 đến nucleotit 7265; f) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 từ nucleotit 217 đến nucleotit 240; và g) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408.

66. Phân tử axit nucleic theo điểm 64, trong đó trình tự nucleotit này bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11.

67. Phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc phần bổ sung của nó.

68. Phân tử ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 từ nucleotit 1441 đến nucleotit 1462, và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của nó.

69. Phân tử ADN theo điểm 68, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 từ nucleotit 1431 đến nucleotit 1472, và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

70. Phân tử ADN chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 và trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

71. Phân tử ADN chứa locus di truyền nhân tạo chứa theo thứ tự các trình tự nucleotit sau: a) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 từ nucleotit 1 đến 1451; b) trình tự nucleotit bổ sung cho trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 từ nucleotit 6760 đến nucleotit 6958; c) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 từ nucleotit 6874 đến nucleotit 7298; d) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 từ nucleotit 7 đến nucleotit 7291; e) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 từ nucleotit 12 đến nucleotit 7265; f) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 từ nucleotit 217 đến nucleotit 240; và g) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408.

72. Phương pháp xác định sự kiện ưu tú EE-GM3 trong mẫu sinh học, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM3 bằng cặp đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và ADN ngoại lai được cài xen liền kề với nó; hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

73. Phương pháp theo điểm 72, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại đoạn ADN có từ 50 đến 1000 cặp bazơ từ axit nucleic có mặt trong mẫu sinh học bằng cách áp dụng phản ứng chuỗi polymeraza sử dụng ít nhất hai đoạn môi, một trong số các đoạn môi này nhận dạng vùng bên sườn đầu 5' của ADN ngoại lai mang gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn đầu 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc vùng bên sườn đầu 3' của ADN ngoại lai mang gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn đầu 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID

NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843 hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240 hoặc đoạn mỗi còn lại trong số các đoạn mỗi này nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

74. Phương pháp theo điểm 73, trong đó đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 5' chứa trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 3' của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai có 17 đến 200 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

75. Phương pháp theo điểm 73, trong đó đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 5' chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 3' của EE-GM3 chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai có, ở đầu 3' của nó, ít nhất là 17 nucleotit liền kề được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

76. Phương pháp theo điểm 75, trong đó các đoạn mỗi lần lượt chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5 và SEQ ID NO. 4, hoặc lần lượt chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5 và SEQ ID NO. 7.

77. Phương pháp theo điểm 76, trong đó phương pháp này bao gồm bước khuếch đại đoạn khoảng 263 hoặc 706 cặp bazơ bằng cách áp dụng quy trình xác định EE-GM3 bằng PCR.

78. Kit chứa một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 5' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn đầu 5' nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc một đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn đầu 3' nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và một đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai, ADN ngoại lai nêu trên chứa trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

79. Kit theo điểm 78, trong đó đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 5' chứa trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 3' của EE-GM3 chứa trình tự nucleotit có từ 17 đến 200 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai có 17 đến 200 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

80. Kit theo điểm 79, trong đó đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 5' chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự

nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc đoạn mỗi nhận dạng vùng bên sườn đầu 3' của EE-GM3 chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn mỗi nhận dạng trình tự nằm trong ADN ngoại lai có, ở đầu 3' của nó, ít nhất là 17 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

81. Kit theo điểm 79, trong đó kit này chứa đoạn mỗi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4 và đoạn mỗi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5, hoặc chứa đoạn mỗi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5 và đoạn mỗi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO. 7.

82. Cặp đoạn mỗi, bao gồm đoạn mỗi thứ nhất mà, trong các điều kiện phát hiện đặc hiệu EE-GM3 đã được tối ưu hóa, nhận dạng một cách đặc hiệu trình tự nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3, vùng bên sườn đầu 5' nêu trên bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 và vùng bên sườn đầu 3' nêu trên bao gồm trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn mỗi thứ hai mà nhận dạng trình tự trong ADN ngoại lai liên kế với vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' nêu trên trong EE-GM3, ADN ngoại lai này bao gồm trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1843, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 1 hoặc phần bổ sung của nó, hoặc trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 11 từ vị trí nucleotit 1452 đến vị trí nucleotit 16638 hoặc phần bổ sung của nó.

83. Cặp đoạn mỗi theo điểm 82, trong đó đoạn mỗi thứ nhất chứa trình tự nucleotit có 17 đến 200 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408, và đoạn mỗi thứ hai chứa trình tự nucleotit có từ 17 đến 200 nucleotit liên kế được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 1 đến nucleotit 240.

84. Cặp đoạn mỗi theo điểm 82, trong đó đoạn mỗi thứ nhất chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên kề được chọn từ trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1 đến nucleotit 1451 hoặc trình tự nucleotit có ít nhất là 17 nucleotit liên kề được chọn từ trình tự nucleotit của phần bổ sung của SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 1408.

85. Cặp đoạn mỗi theo điểm 82, trong đó đoạn mỗi thứ nhất chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5.

86. Cặp đoạn mỗi bao gồm đoạn mỗi thứ nhất chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nêu trong SEQ ID NO. 5 và đoạn mỗi thứ hai chứa, ở đầu 3' của nó, trình tự nêu trong SEQ ID NO. 4, trong đó: ít nhất một trong các đoạn mỗi này được đánh dấu; đầu 5' của ít nhất một trong đoạn mỗi này bao gồm một hoặc nhiều bắt cặp nhằm hoặc trình tự nucleotit không liên quan đến trình tự bên sườn đầu 5' hoặc 3' của trình tự ADN ngoại lai, ít nhất một trong các đoạn mỗi này chứa trình tự nucleotit ở đầu 3' của nó mà kéo dài qua vùng liên kết giữa các trình tự có nguồn gốc từ ADN thực vật và trình tự ADN ngoại lai, vùng liên kết này là ở các nucleotit 1451-1452 trong SEQ ID NO. 2 hoặc các nucleotit 240-241 trong SEQ ID NO. 3, với điều kiện là 17 nucleotit liên kề ở đầu 3' không có nguồn gốc duy nhất từ ADN ngoại lai hoặc trình tự có nguồn gốc từ thực vật trong SEQ ID NO. 2 hoặc 3; hoặc ít nhất một trong các đoạn mỗi này chứa trình tự có mức độ tương đồng nằm trong khoảng từ 80 đến 100% với trình tự lần lượt nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' của sự kiện ưu tú hoặc ADN ngoại lai của sự kiện ưu tú này, và trình tự đoạn mỗi này bao gồm ít nhất một bắt cặp nhằm với vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' này hoặc ADN ngoại lai này, với điều kiện là ít nhất một bắt cặp nhằm này vẫn cho phép xác định một cách đặc hiệu sự kiện ưu tú bằng các đoạn mỗi này trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa.

87. Phương pháp theo điểm 72, trong đó phương pháp này bao gồm bước lai axit nucleic của mẫu sinh học với mẫu dò đặc hiệu đối với EE-GM3.

88. Phương pháp theo điểm 87, trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn đầu 5' hoặc trình tự bên sườn đầu 3' của EE-GM3 và trình tự của ADN ngoại lai tiếp giáp nó.

89. Phương pháp theo điểm 88, trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% với trình tự nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1431 đến 1472 hoặc SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 220 đến 261, hoặc phần bổ sung của các trình tự này.

90. Kit chứa mẫu dò đặc hiệu, có khả năng lai một cách đặc hiệu với vùng đặc hiệu của EE-GM3, trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu nêu trên có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn đầu 5' hoặc trình tự bên sườn đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và trình tự của ADN ngoại lai tiếp giáp nó; hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

91. Kit theo điểm 90, trong đó trình tự của mẫu dò đặc hiệu chứa trình tự nucleotit có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

92. Mẫu dò đặc hiệu chứa trình tự nucleotit có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% với trình tự chứa một phần của trình tự bên sườn đầu 5' hoặc trình tự bên sườn đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và trình tự của ADN ngoại lai tiếp giáp nó, hoặc phần bổ sung của chúng; hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

93. Mẫu dò theo điểm 92, trong đó mẫu dò này có mức độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% với SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

94. Mẫu dò đặc hiệu chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1441 đến 1462 hoặc SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 230 đến 251, hoặc phần bổ sung của các trình tự nêu trên.

95. Phương pháp xác nhận độ tinh khiết của hạt, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM3 bằng đoạn mồi hoặc mẫu dò đặc hiệu mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và ADN ngoại lai đã được cài xen tiếp giáp nó trong mẫu hạt; hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

96. Phương pháp sàng lọc hạt theo sự có mặt của EE-GM3, trong đó phương pháp này bao gồm bước phát hiện vùng đặc hiệu EE-GM3 bằng đoạn môi hoặc mẫu dò đặc hiệu mà nhận dạng một cách đặc hiệu vùng bên sườn đầu 5' hoặc đầu 3' của ADN ngoại lai chứa gen chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3 và ADN ngoại lai đã được cài xen tiếp giáp nó trong mẫu lô hạt; hạt quy chiếu mang sự kiện ưu tú EE-GM3 đã được nộp lưu tại NCIMB với số nộp lưu NCIMB 41659.

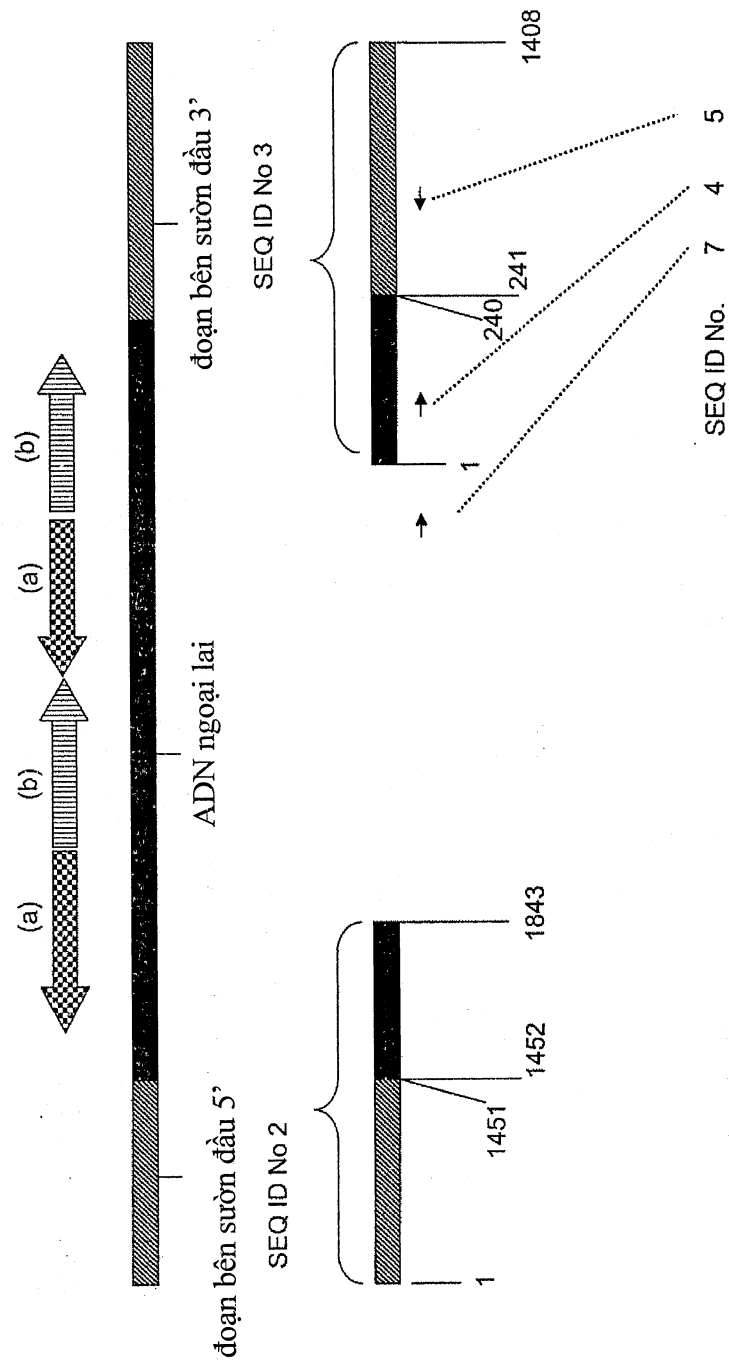
97. Phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ưu tú EE-GM3 trong mẫu sinh học bằng cách lai với mẫu dò axit nucleic đã được đánh dấu về cơ bản là theo cách bổ sung, trong đó tỷ lệ mẫu dò:axit nucleic đích được khuếch đại bằng cách tái sử dụng trình tự axit nucleic đích, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: a) lai trình tự axit nucleic đích nêu trên với oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1452 đến nucleotit 1469 hoặc phần bổ sung của nó hoặc oligonucleotit của axit nucleic thứ nhất nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 223 đến nucleotit 240 hoặc phần bổ sung của nó; b) lai trình tự axit nucleic đích nêu trên với oligonucleotit của axit nucleic thứ hai chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 2 từ nucleotit 1434 đến nucleotit 1451 hoặc phần bổ sung của nó hoặc mẫu dò axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO. 3 từ nucleotit 241 đến nucleotit 258 hoặc phần bổ sung của nó, trong đó oligonucleotit thứ nhất và thứ hai nêu trên trùng ít nhất một nucleotit và trong đó oligonucleotit thứ nhất nêu trên hoặc oligonucleotit thứ hai nêu trên được đánh dấu để làm mẫu dò axit nucleic đã được đánh dấu nêu trên; c) chỉ phân cắt mẫu dò đã được đánh dấu trong bộ đôi mẫu dò:trình tự axit nucleic đích bằng enzym mà phân cắt mẫu dò chọn lọc để phân ly bộ đôi sao cho để lại trình tự đích còn nguyên vẹn; d) tái sử dụng trình tự axit nucleic đích bằng cách lặp lại các bước (a) đến (c); và e) phát hiện mẫu dò đã được đánh dấu và phân cắt, bằng cách đó xác định được sự có mặt của trình tự axit nucleic đích nêu trên.

98. Kit theo điểm 78, trong đó ít nhất một trong các đoạn môi này được đánh dấu, hoặc trong đó đầu 5' của ít nhất một trong các đoạn môi này bao gồm một hoặc nhiều bất cặp nhằm hoặc trình tự nucleotit không liên quan đến trình tự bên sườn đầu 5' hoặc 3' của trình tự ADN ngoại lai, hoặc trong đó ít nhất một trong các đoạn môi này chứa trình tự nucleotit ở đầu 3' của nó mà kéo dài qua vùng liên kết giữa các trình tự có nguồn gốc từ ADN thực vật và trình tự ADN ngoại lai, vùng liên kết này là ở các

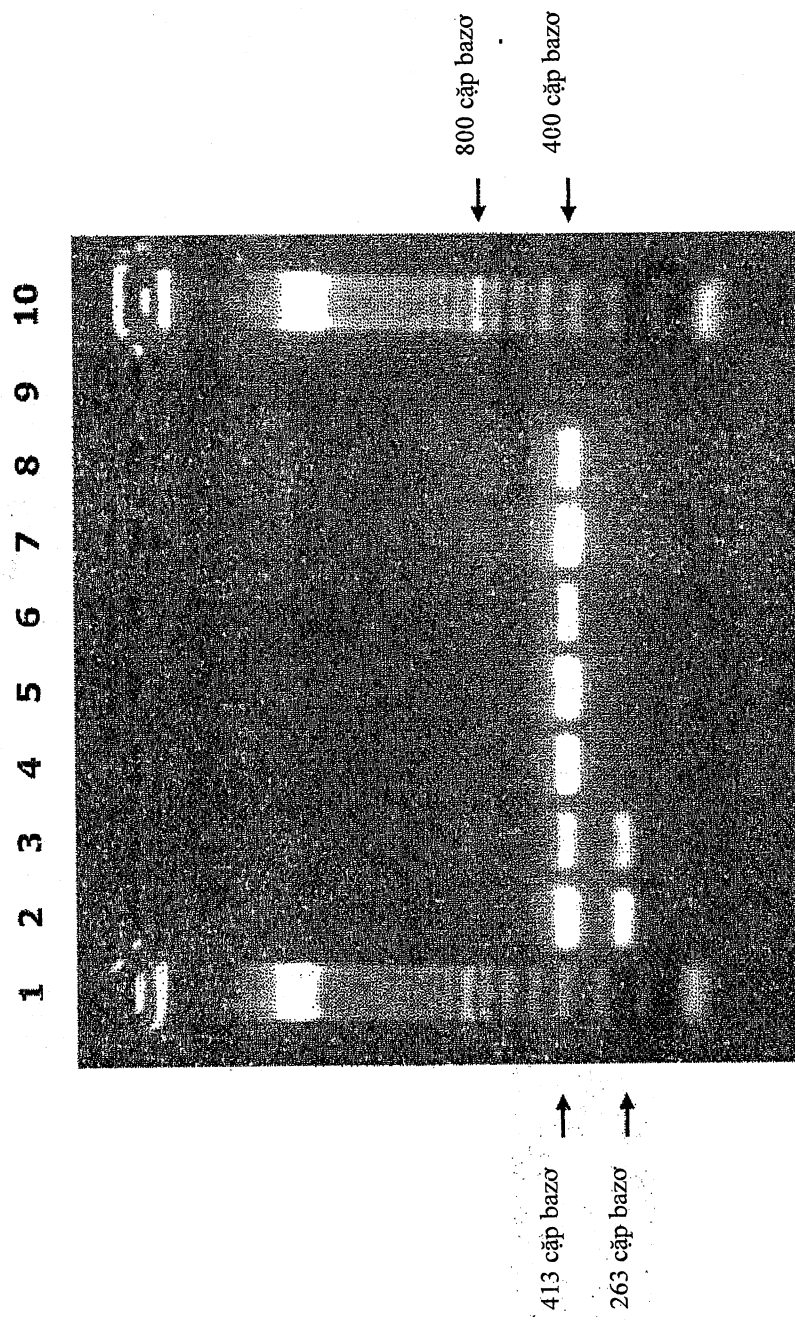
nucleotit 1451-1452 trong SEQ ID NO. 2 hoặc các nucleotit 240-241 trong SEQ ID NO. 3, với điều kiện là 17 nucleotit liên kề ở đầu 3' không có nguồn gốc duy nhất từ ADN ngoại lai hoặc trình tự có nguồn gốc từ thực vật trong SEQ ID NO. 2 hoặc 3, hoặc trong đó ít nhất một trong các đoạn mỗi này chứa trình tự có mức độ tương đồng nằm trong khoảng từ 80 đến 100% với trình tự lần lượt nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' của sự kiện ưu tú hoặc ADN ngoại lai của sự kiện ưu tú này, và trình tự đoạn mỗi này bao gồm ít nhất một bắt cặp nhằm với vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' này hoặc ADN ngoại lai này, với điều kiện là ít nhất một bắt cặp nhằm này vẫn cho phép xác định một cách đặc hiệu sự kiện ưu tú bằng các đoạn mỗi này trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa.

99. Cặp đoạn mỗi theo điểm 82, trong đó ít nhất một trong các đoạn mỗi được đánh dấu, hoặc trong đó đầu 5' của ít nhất một trong các đoạn mỗi này bao gồm một hoặc nhiều bắt cặp nhằm hoặc trình tự nucleotit không liên quan đến trình tự bên sườn đầu 5' hoặc 3' của trình tự ADN ngoại lai, hoặc trong đó ít nhất một trong các đoạn mỗi này chứa trình tự nucleotit ở đầu 3' của nó mà kéo dài qua vùng liên kết giữa các trình tự có nguồn gốc từ ADN thực vật và trình tự ADN ngoại lai, vùng liên kết này là ở các nucleotit 1451-1452 trong SEQ ID NO. 2 hoặc các nucleotit 240-241 trong SEQ ID NO. 3, với điều kiện là 17 nucleotit liên kề ở đầu 3' không có nguồn gốc duy nhất từ ADN ngoại lai hoặc trình tự có nguồn gốc từ thực vật trong SEQ ID NO. 2 hoặc 3, hoặc trong đó ít nhất một trong các đoạn mỗi này bao gồm trình tự có mức độ tương đồng nằm trong khoảng từ 80 đến 100% với trình tự lần lượt nằm trong vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' của sự kiện ưu tú hoặc ADN ngoại lai của sự kiện ưu tú này, và trình tự đoạn mỗi này bao gồm ít nhất một bắt cặp nhằm với vùng bên sườn đầu 5' hoặc 3' này hoặc ADN ngoại lai này, với điều kiện là ít nhất một bắt cặp nhằm này vẫn cho phép xác định một cách đặc hiệu sự kiện ưu tú bằng các đoạn mỗi này trong các điều kiện PCR đã được tối ưu hóa.

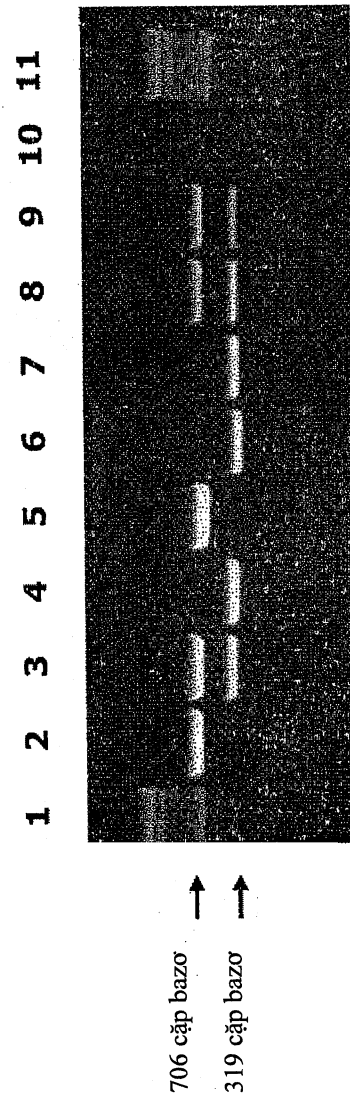
HÌNH 1



HÌNH 2



HÌNH 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Bayer BioScience N.V.
M.S Technologies LLP
MASON Justin Thomas
LETTOW Leslie James
EBY Mark Alan
EBY William H.
WELZ Gunter
VERHAEGHE Steven
DE BEUCKELEER Marc
HABEX Veerle
FERRULO Jean-Marc
- <120> Cây đậu tương chuyển gen mang sự kiện ưu tú EE-GM3, phương pháp và kit để xác định sự kiện này trong mẫu sinh học
- <130> BCS 09-2009
- <140> tba
<141> 2010-11-23
- <150> 09014564.0
<151> 2009-11-23
- <150> 61/263,690
<151> 2009-11-23
- <150> 61/367,227
<151> 2010-07-23
- <160> 13
- <170> PatentIn phiên bản 3.3
- <210> 1
<211> 7296
<212> ADN
<213> nhân tạo
- <220>
<223> Đoạn SalI của vector pSF10
- <220>
<221> gen kết thúc
<222> (188)..(479)
<223> 3' nos: trình tự bao gồm cả vùng không dịch mã đầu đầu 3' của gen nopaline synthaza từ ADN T của pTiT37 của Agrobacterium tumefaciens - bổ sung
- <220>
<221> misc_feature
<222> (480)..(1556)
<223> hppdPF W336: trình tự mã hóa 4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza của chủng Pseudomonas fluorescens A32 biến đổi bằng cách thay axit amin Glyxin 336 bằng Tryptophan - bổ sung
- <220>
<221> peptit trung chuyển
<222> (1557)..(1928)
<223> TPotp Y: trình tự mã hóa peptit trung chuyển đã được tối ưu hóa

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

<220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1929) .. (2069)
 <223> 5' tev: trình tự bao gồm trình tự dẫn đầu của virus gây bệnh Etching ở cây thuốc lá - bổ sung

<220>
 <221> trình tự khởi đầu
 <222> (2070) .. (3359)
 <223> Ph4a748 ABBC: trình tự bao gồm vùng trình tự khởi đầu của gen histon H4 của *Arabidopsis thaliana*, chứa đột biến lặp đoạn bên trong -bổ sung

<220>
 <221> trình tự khởi đầu
 <222> (3360) .. (4374)
 <223> Ph4a748: trình tự bao gồm trình tự khởi đầu của gen histon H4 của *Arabidopsis thaliana*,

<220>
 <221> Intron
 <222> (4375) .. (4855)
 <223> intron1 h3At: intron thứ nhất của gen II của biến thể histon H3.III của *Arabidopsis thaliana*

<220>
 <221> peptit trung chuyển
 <222> (4856) .. (5227)
 <223> TPotP C: trình tự mã hóa của peptit trung chuyển đã được tối ưu hóa, chứa trình tự của gen tiểu đơn vị nhỏ RuBisCO của *Zea mays* (ngô) và *Helianthus annuus* (hướng dương)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5228) .. (6565)
 <223> 2mepsps: trình tự mã hóa gen biến thể kép 5-enol-pyruvylshikimat-3-phosphat synthaza của *Zea mays* (ngô) (Lebrun et al., 1997)

<220>
 <221> gen kết thúc
 <222> (6566) .. (7252)
 <223> 3' histonAt: trình tự bao gồm cả vùng không dịch mã đầu 3' của gen histon H4 của *Arabidopsis thaliana* (Chabouté et al., 1987)

```
<400> 1
gtcgactcta gcagatctgg ccggcccacc ggtgggccat atgggcccg cggccgcaat 60
tcgagctcgg tacctacctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta agttgggtaa 120
cgccagggtt ttcccagtca cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattg cggccgcaat 180
tcccgatcta gtaacataga tgacaccgcg cgcgataatt taccctagtt tgcgcgctat 240
atattgtttt ctatcgcgta ttaaatgtat aattgcggga ctctaatacat aaaaacccat 300
ctcataaata acgtcatgca ttacatgtta attattacat gcttaacgta attcaacaga 360
aattatatga taatcatcgc aagaccggca acaggattca atcttaagaa actttattgc 420
```

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

agtgatccgc gtgatggcag tgatagccac taagaatcgt cttttgtttt acatgtggcg 2340
 ccacaaatta gggtaatgaa gcggcaatat tttggaactc ggaaaataaa attgcgccat 2400
 cacattattt gaaaattttc acatgctttt attttaaaaa cccacgaatt acaagttaca 2460
 accgaaaaag atttataata tagtgattta tactaatttt gtagtagctt aatgtatat 2520
 gatactggaa aaacaatgac aatcatatga tccgtgtgta caataaaatg atgtataaac 2580
 cgtcgatctg ttttaatcga cggttcatat tagtgatccg cgtgatggca gtgatagcca 2640
 ctaagaatcg tcttttgttt tacatgtggc gccacaaatt agggtaatga agcggcaata 2700
 ttttggaact cggaaaataa aattgcgcca tcacattatt tgaaaatttt cacatgcttt 2760
 tattttaaaa acccacgaat tacaagttac aaccgaaaaa gattttataat atagtgtatt 2820
 atactaattt tgtagtagct taatgtatat tgatactgga aaaacaatga caatcatatg 2880
 ttagtattat caagttatcg tattgatatt gatattggaa catacaatgg gtattgcctt 2940
 ctttcgacca taaatatcac caaatttaca aagtttgtgt ataccaagtt atcaattgta 3000
 aatgggatgt caacatttta atttcccttt gagaaactat agaccacaag aacacacttc 3060
 aatagataaa gtaactattt acataagagg ttttaaaatc acattaacaa aaataattac 3120
 caaccggcac tcacaaatac aaacagagca cagcatatgt caaagccaca agtaaattcg 3180
 ttgagtgggtg gtttcattac aattgtgtca cttgcagcac aaactatctt gctctgggaa 3240
 tcattctcagc atcaaagatc atgctcactt caggggaact tagtgtatcc atgcctcgac 3300
 tcatattttt cctcgacctg caggcatgca agctctagag cggccgccac cgcggtggag 3360
 gtactcgagt cgcgacgtac gttcgaacaa ttggttttta aagcttgcac gcctgcaggt 3420
 cgaggagaaa tatgagtcga ggcattggata cactaagttc ccctgaagtg agcatgatct 3480
 ttgatgctga gatgattccc agagcaagat agtttgtgct gcaagtgaca caattgtaat 3540
 gaaaccacca ctcaacgaat ttacttgtgg ctttgacatg tcgtgtgctc tgtttgtatt 3600
 tgtgagtgcc ggttggtaat tatttttgtt aatgtgattt taaaacctct tatgtaaata 3660
 gttactttat ctattgaagt gtgttcttgt ggtctatagt ttctcaaagg gaaattaaaa 3720
 tgttgacatc ccattttaca ttgataactt ggtatacaca aactttgtaa atttggtgat 3780
 atttatggtc gaaagaaggc aataccatt gtatgttcca atatcaatat caatacgata 3840
 acttgataat actaacatat gattgtcatt gttttccag tatcaatata cattaagcta 3900
 ctacaaaatt agtataaatc actatattat aaatcttttt cggttgtaac ttgtaattcg 3960
 tgggtttttt aaataaaaagc atgtgaaaat tttcaaataa tgtgatggcg caattttatt 4020
 ttccgagttc caaaatattg ccgcttcatt accctaattt gtggcgccac atgtaaaaca 4080
 aaagacgatt cttagtggct atcactgcca tcacgcggat cactaatatg aaccgtcgat 4140
 taaaacagat cgacggttta tacatcattt tattgtacac acggatcgat atctcagccg 4200

ttagatttaa	tatgcgatct	gattgctcaa	aaaatagact	ctccgtcttt	gcctataaaa	4260
acaatttcac	atctttctca	cccaaatacta	ctcttaaccg	ttctttcttct	tctacagaca	4320
tcaattttctc	tcgactctag	aggatccaag	cttatcgatt	tcgaaccctt	caggcgaaga	4380
acaggtatga	tttgtttgta	attagatcag	gggttttaggt	ctttccatta	ctttttaatg	4440
ttttttctgt	tactgtctcc	gcgatctgat	tttacgacaa	tagagtttcg	ggttttgtcc	4500
cattccagtt	tgaaaataaa	ggtccgtctt	ttaagtttgc	tggatcgata	aacctgtgaa	4560
gattgagtct	agtcgattta	ttggatgata	cattcttcat	cgtttttttc	ttgcttcgaa	4620
gttctgtata	accagatttg	tctgtgtgcg	attgtcatta	cctagccgtg	tatcgagaac	4680
taggggttttc	gagtcaattt	tgcccccttt	ggttatatct	ggttcgataa	cgattcatct	4740
ggattaggg	tttaagtgg	gacgtttagt	attccaattt	cttcaaaatt	tagttatgga	4800
taatgaaaat	cccccaattga	ctgttcaatt	tcttgttaaa	tgcgagatc	cccatggctt	4860
cgatctcctc	ctcagtcgcg	accgtttagcc	ggaccgcccc	tgctcaggcc	aacatgggtg	4920
ctccgttcac	cggccttaag	tccaacgccg	ccttccccac	caccaagaag	gctaacgact	4980
tctccaccct	tcccagcaac	ggtggaagag	ttcaatgtat	gcaggtgtgg	ccggcctacg	5040
gcaacaagaa	gttcgagacg	ctgtcgtacc	tgccgccgct	gtctatggcg	cccaccgtga	5100
tgatggcctc	gtcggccacc	gccgtcgctc	cgttccaggg	gctcaagtcc	accgccagcc	5160
tccccgtcgc	cggccgctcc	tccagaagcc	tcggcaacgt	cagcaacggc	ggaaggatcc	5220
ggtgcatggc	cggcgccgag	gagatcgctc	tgagcccat	caaggagatc	tccggcaccg	5280
tcaagctgcc	ggggtccaag	tcgctttcca	accggatcct	cctactcgcc	gccctgtccg	5340
aggggacaac	agtggttgat	aacctgctga	acagtgagga	tgtccactac	atgctcgggg	5400
ccttgaggac	tcttggtctc	tctgtcgaag	cggacaaagc	tgccaaaaga	gctgtagttg	5460
ttggctgtgg	tggaaagttc	ccagttgagg	atgctaaaga	ggaagtgcag	ctcttcttgg	5520
ggaatgctgg	aatcgcaatg	cggtccttga	cagcagctgt	tactgctgct	ggtggaaatg	5580
caacttacgt	gcttgatgga	gtaccaagaa	tgagggagag	acccattggc	gacttggttg	5640
tcggattgaa	gcagcttgg	gcagatgttg	attgtttcct	tggcactgac	tgccacctg	5700
ttcgtgtcaa	tggaaatcga	gggctacctg	gtggcaaggt	caagctgtct	ggctccatca	5760
gcagtcagta	cttgagtgcc	ttgctgatgg	ctgctccttt	ggctcttggg	gatgtggaga	5820
ttgaaatcat	tgataaatta	atctccattc	cgtacgtcga	aatgacattg	agattgatgg	5880
agcgtttttg	tgtgaaagca	gagcattctg	atagctggga	cagattctac	attaagggag	5940
gtcaaaaata	caagtcccct	aaaaatgcct	atgttgaagg	tgatgcctca	agcgcaagct	6000
atttcttggc	tggtgctgca	attactggag	ggactgtgac	tgtggaaggt	tgtggcacca	6060

```

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

```

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

<220>
 <223> vùng bên sườn đầu 5' của ADN ngoại lai mang gen truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1451)
 <223> ADN thực vật

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1452)..(1843)
 <223> cài xen hoặc ADN ngoại lai

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

<210> 3
 <211> 1408
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> trình tự bên sườn đầu 3' của ADN ngoại lai mang gen truyền tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ trong EE-GM3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(240)
 <223> cài xen hoặc ADN ngoại lai

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (241)..(1408)
 <223> ADN thực vật

```
<400> 3
taacagtgag ctgatataaa accgaaacaa accggtacaa gtttgattga gcaacttgat      60
gacaaacttc agaatttttg ttattgaatg aaaatcatag tctaatcgta aaaaatgtac      120
agaagaaaag ctagagcaga acaaagattc tatattcttg ttccaattta tcatcgcttt      180
aacgtccctc agatttgatc gggctgcagg aattaatgtg gttcatccgt ctttttgtt      240
atgcggtcat caatacgtgc ctcaaagatt gccaaataga ttaatgtggt tcatctccct      300
atatgttttg cttgttggat ttgctatca catgtttatt gtcctaaact aattataata      360
aaatgacttt caaatgattg gtgttgacat tcttttcaaa ttgttcgctg aagaaaagat      420
aatctcgagg ccttgatttg ttaatgcttt cattaataaa taaataaaat aactctttcc      480
aaatttcaat tcatgctttt atattgtgtg gttcatcctc atcttatgtc actattatca      540
tttcatgttt gagactttac ttggccatat ttgagaagac cttcttcatt ataggcaatt      600
ttatctccac aataatataa gagaatatct tgaattaata attattgagg atatattata      660
gggttctatg tggaactaaa gacatggtta ccccatthaag agagagtata gaggaattac      720
ttttattttg cacgaggcga cgcgacttgt atttattttg gaattgtact ttgctgtgag      780
cagtgtggct ctatgttggg gcctccactt gttggtgttt tatatatgtg aaaggaggat      840
gaggggtgat gttcatttct ttgcattatt ttgtttattc gcgcgaatga tatatgccct      900
gtttttgaag attgataggg aagtcctat ataggaattg aagtgtcaaa aggggtgtgag      960
tatgtgctat gataatcacc caattaatgt acatctggtg tgggtgtttga atttgtaggt     1020
cattaattaa ttttctctt ggtgaagttt ggagttcttt tgcaattaca attctgtttt     1080
gtaagtgatt atgatggact tttagatgtt tctcaaacag taggtgtaaa gaaaaatggg     1140
ccctggtatg aaaatttggt ttactcttt ctcatccta tctttaaaaa aagaatgata     1200
attttgtaat aaaaataaaa aaatatataa ttttttctca aatcaaacaa cctttatttt     1260
```


ttatgccaac aataattttg ttaaagatgg agatttcaat tattatataa gagttcatta 1320
 tagttgaaaa ttgaatgaat gtatatgttt acgttttttg tctcaagtga aactaagatc 1380
 aaatattcat atctattgag ctggtcctt 1408

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SOY028

<400> 4
 atcgctttaa cgtccctcag 20

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SOY029

<400> 5
 caaggcctcg agattatc 18

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SMP187

<400> 6
 atatcaaccg gtagctcgac 20

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

<220>
 <223> đoạn môi STV019

<400> 7
 ggcattaaat tgggtgaaaat tgc 23

<210> 8
 <211> 263
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của đơn vị siêu sao chép PCR bằng cách sử dụng các đoạn môi SOY028 - SOY029

<400> 8
 atcgcttttaa cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtgggt tcatccgtct 60
 ttttgttaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt aatgtgggtc 120
 atctccctat atgttttgct tgttggattt tgctatcaca tgttttattgc tccaaactaa 180
 ttataataaaa atgactttca aatgattgggt gttgacattc ttttcaaatt gttcgctgaa 240
 gaaaagataa tctcgaggcc ttg 263

<210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mồi 1 để khuếch đại đoạn đối chứng (SOY01)

<400>
 gtcagccaca cagtgccctat 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mồi 2 để khuếch đại đoạn đối chứng (SOY02)

<400> 10
 gttaccgtac aggtctttcc 20

<210> 11
 <211> 17806
 <212> ADN
 <213> nhân tạo
 <220>
 <223> trình tự nucleotit của ADN ngoại lai và các trình tự bên sườn thực vật trong sự kiện EE-GM3

<400> 11
 gacttccatg tctagattca ttgtactaag atttcaaacg atatatatat atatatatat 60
 atatatatatc aattacatct ttttcaaaaa acatatatgc atcgtatttt ctaatacatt 120
 tttttatata tgttattagt taaaatttat taaaaatcat aaaattaagt aagtttcaca 180
 taacatccaa tgattttctc gtaattttta gactggacta aagaatatag tagtaacact 240
 tctcttcaaa taatatactt tatttgcccg aggaatagca ttgccatatt gaactattag 300
 gaaagctgaa catcaattgg tacacttgga tggttccac ggttttattat tgtctacatc 360
 tggatcatcca agcagagggt atatcttcta taactcgaca aatcttcggt gtgcctatat 420
 agagttgctt gtacgactaa aacgcttata ataatcggtta tacaatctat gattcacagt 480

tatgatacgt gtatgcaata aatgaataga tagataaata tgatacaatt atacaattat	540
tctaaaatat atagaataca atatatgtat gtataaaaaa ttcataaaac accaataagc	600
atataattgc aattttgcaa aaccaaatta agaataaac tcaaatatta ctagaacaa	660
aaaaaattat aaatcattgt cttcataaat taattctaag tatctacaaa tagaaataat	720
atgaatttta tataaaaaag taatataaat tttattcctt tcttaaattt atgaaaaata	780
atacttctat atttctatac atgtttctat acatgcgttt caatgtctga tagtgatagg	840
aaactctact gtattttcaa aagttttttt ttgtttaaat atattttttg tcatgtaatt	900
gtgtgtgttt tcatttacgt ccatgtaaaa agaaaatatt ttagttctat taaaatattt	960
tttttatttt ttatccttaa aatactttta ataataattt ttcctattta aagcattttt	1020
tataatttaa agcgctattt aaaacgtttt tagaataaaa acataaaaca aacacatttt	1080
aaaatgattg aaatgaaaaa taaaactaat gaaaacgaaa acaatactaa attacaggaa	1140
agaaaaatat attcaaactt ttatgtttta aggtttttga atatttctct gattcgtttg	1200
aaatatgtga agaaaattaa aatatcaagt agtaggttac aacagttcgg gtgcaacagt	1260
gactatgaca gcaagataat agggccaata tatttgata cctctcttaa gacgtaaaca	1320
ttttgagcga gaaaataatg gaaaaaaaat aagtcattca aatgataata gatataataa	1380
ttatttttta ttttaaatat cttattaata tttttatttt tttatcatat tataaattat	1440
attatattta tgtagctttg ctcatgtct tctacgggaa ctttcccga cataggaacc	1500
gccctttcgt taccctcatc catcgtgaaa tcaggaaata aatgttcgaa gatttgaggt	1560
caaaagtcga atttcatgtt gtctcttcta tttagataca aaattgaagc aattttcacc	1620
aatttaatgc caaaatttaa aacaacgctg tcctgatttc acgatggatg aggataacga	1680
aagggcggtt cctatgtccg ggaaagttcc cgtagaagac aatgagcaaa gctactgaaa	1740
cgcgacacg acgtcgcat ggtacggata tgagttaaac cgactcaatt cttttattaa	1800
gacataaacc gattttgggt aaagtgtaac agtgagctga tataaaaccg aaacaaaccg	1860
gtacaagttt gattgagcaa cttgatgaca aacttcagaa ttttggttat tgaatgaaaa	1920
tcatagtcta atcgtaaaaa atgtacagaa gaaaagctag agcagaacaa agattctata	1980
ttctggttcc aatttatcat cgctttaacg tccctcagat ttgatcgggc tgcaggaatt	2040
aaacgcccgg gcacgtggga tcctctagag tcgactctag cagatctggc cggcccaccg	2100
gtgggccata tgggcccgcg gccgcgaatt cgagctcggg acctacctgg cgaaaggggg	2160
atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa	2220
aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag taacatagat gacaccgcgc	2280
gcgataattt atcctagttt gcgcgctata ttttgttttc tatcgcgtat taaatgtata	2340
attgcgggac tctaatacata aaaacccatc tcataataaa cgtcatgcat tacatgttaa	2400

ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat aatcatcgca agaccggcaa	2460
caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga acgatcgggg aaattcgtcg	2520
agtcaccctc ggccgggctt tttgacgctt aatcggcggg caatacacca cgacgcacct	2580
ggtcacgttc gatggactcg aacagcgctt tgaagttcca ctgcctaaac ccatcgtcgc	2640
ccttgcgctg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag ggtttccgag aagatctgca	2700
gcagcaggcg tttgtcgctt tccacggaag atccgtccag caggataccg cgtgcctgca	2760
gttgatccac cggctcgccg tggtcaggca ggcggccttc gagcatttcg taataagtgt	2820
ctggcggcgc ggtcatgaag cgcattccga ttttcttcaa cgcgtcccag gtcttgacca	2880
ggtcgtcggg gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc gttgaactgc atcaggaact	2940
cttcgatctg ccccgcgccc ttggacgact cttcgttcag cgggatgcgg atcatgccgt	3000
ccggcgcact catggccttg gaagtcaggc cgggtgtact gcccttgata tcgaagtaac	3060
gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc ccagtagacc atgcggccgc	3120
gatagacgtt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc tgcaccgacc ggattgcgct	3180
ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga gctgccttcg ccgaaacggg	3240
cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc cttgatcgc cggcaggttc aattccatcg	3300
gcccgggtgtc aatatggatc ggctgggcgc cgagttccag ggcgcgggtg taggcctttt	3360
gcgagtcctt cacgcggaac gccatgccgc acaccgacgg gccgtgttcg gccgcaaagt	3420
aggaggcgat gctgttgggc tcgttggtga ggatcagggt gatctcgccc tggcgggtaca	3480
gggtgcacgtt cttggaacgg tgggtcgcga ctttggtgaa gcccatgatc tcgaagatcg	3540
gctccagggt acccggcgtc ggcgacgcga attcgatgaa ttcaaagccc atcaggccca	3600
ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttc gccgttgctg acgttgccga	3660
ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg ggacttgagc ccctggaacg	3720
gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg cgccatagac agcggcggca	3780
ggtacgacag cgtctcgaac ttcttggtgc cgtaggccgg ccacacctgc atatattgaa	3840
ctcttcacc gttgctggga aggggtggaga agtcgttagc cttcttggtg gtggggaagg	3900
cggcgttgga ctttaaggccg gtgaacggag ccaccatgtt ggcctgagca ggggcggtcc	3960
ggctaacggg cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc tatcgttcgt aaatggtgaa	4020
aattttcaga aaattgcttt tgctttaaaa gaaatgattt aaattgctgc aatagaagta	4080
gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttgtt ttgtatatgt tgtgttgaga attctagagt	4140
cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacggttaa gagtagattt gggtgagaaa	4200
gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat tttttgagca atcagatcgc	4260

atatttaa	atc	taacggctga	gatatcgatc	cgtgtgtaca	ataaaatgat	gtataaaccg	4320
tcgatctgtt	ttaatcgacg	gttcatatta	gtgatccgcg	tgatggcagt	gatagccact		4380
aagaatcgtc	ttttgtttta	catgtggcgc	cacaaattag	ggtaatgaag	cggcaatatt		4440
ttggaactcg	gaaaataaaa	ttgcgccatc	acattatttg	aaaattttca	catgctttta		4500
ttttaaaaac	ccacgaatta	caagttacaa	ccgaaaaaga	tttataatat	agtgatttat		4560
actaattttg	tagtagctta	atgtatat	atggtatg	atactggaaa	aacaatgaca	atcataatcg	4620
atccgtgtgt	acaataaaat	gatgtataaa	ccgtcgatct	gttttaatcg	acggttcata		4680
ttagtgatcc	gcgtgatggc	agtgatagcc	actaagaatc	gtcttttggt	ttacatgtgg		4740
cgccacaaat	tagggtaatg	aagcggcaat	attttggaa	tcggaaaata	aaattgcgcc		4800
atcacattat	ttgaaaattt	tcacatgctt	ttatttttaa	aaccacgaa	ttacaagtta		4860
caaccgaaaa	agatttataa	tatagtgatt	tataactaatt	ttgtagtagc	ttaatgtata		4920
ttgatactgg	aaaaacaatg	acaatcatat	gttagtatta	tcaagttatc	gtattgatat		4980
tgatattgga	acatacaatg	ggtattgcct	tctttcgacc	ataaatatca	ccaaattttac		5040
aaagtttggt	tataccaagt	tatcaattgt	aaatgggatg	tcaacatttt	aatttccctt		5100
tgagaaaacta	tagaccacaa	gaacacactt	caatagataa	agtaactatt	tacataagag		5160
gttttaaaat	cacattaaca	aaaataatta	ccaaccggca	ctcacaata	caaacagagc		5220
acacgacatg	tcaaagccac	aagtaaattc	gttgagtggg	ggtttcatta	caattgtgtc		5280
acttgcagca	caaactatct	tgctctggga	atcatctcag	catcaaagat	catgctcact		5340
tcaggggaac	ttagtgatc	catgcctcga	ctcatatttc	tcctcgacct	gcaggcatgc		5400
aagctctaga	gcggccgcca	ccgcggtgga	ggtactcgag	tcgcgacgta	cgttcgaaca		5460
attggtttta	aaagcttgca	tgcttcgagg	tcgaggagaa	atatgagtcg	aggcatggat		5520
acactaagtt	cccctgaagt	gagcatgatc	tttgatgctg	agatgattcc	cagagcaaga		5580
tagtttgatc	tgcaagtga	acaattgtaa	tgaaaccacc	actcaacgaa	tttacttggt		5640
gctttgacat	gtcgtgtgct	ctgtttgtat	ttgtgagtgc	cggttggtaa	ttatttttgt		5700
taatgtgatt	ttaaaacctc	ttatgtaaat	agttacttta	tctattgaag	tgtgttcttg		5760
tggtctatag	tttctcaaag	ggaaattaaa	atgttgacat	cccatttaca	attgataact		5820
tggtatacac	aaactttgta	aatttggtga	tatttatggt	cgaaagaagg	caatacccat		5880
tgtatgttcc	aatatcaata	tcaatacgat	aacttgataa	tactaacata	tgattgtcat		5940
tgtttttcca	gtatcaatat	acattaagct	actacaaaat	tagtataaat	cactatatta		6000
taaatctttt	tcggttgtaa	cttgtaattc	gtgggttttt	aaaataaaag	catgtgaaaa		6060
ttttcaaata	atgtgatggc	gcaattttat	tttccgagtt	ccaaaatatt	gccgcttcat		6120
taccctaatt	tgtggcgcca	catgtaaaac	aaaagacgat	tcttagtggc	tatcactgcc		6180

atcacgcgga	tcactaatat	gaaccgtcga	ttaaaacaga	tcgacggttt	atacatcatt	6240
ttattgtaca	cacggatcga	tatctcagcc	gttagattta	atatgcgac	tgattgctca	6300
aaaaatagac	tctccgtctt	tgcctataaa	aacaatttca	catctttctc	acccaaatct	6360
actcttaacc	gttctttctt	ttctacagac	atcaatttct	ctcgactcta	gaggatccaa	6420
gcttatcgat	ttcgaacccc	tcaggcgaag	aacaggatg	atttgtttgt	aattagatca	6480
ggggtttagg	tctttccatt	actttttaat	gttttttctg	ttactgtctc	cgcgatctga	6540
ttttacgaca	atagagtttc	gggttttgtc	ccattccagt	ttgaaaataa	aggtccgtct	6600
tttaagtttg	ctggatcgat	aaacctgtga	agattgagtc	tagtcgattt	attggatgat	6660
ccattcttca	tcgttttttt	cttgcttcga	agttctgtat	aaccagattt	gtctgtgtgc	6720
gattgtcatt	acntagccgt	gtatcgagaa	ctagggtttt	cgagtcaatt	ttgccccttt	6780
tggttatatc	tggttcgata	acgattcatc	tggattaggg	ttttaagtgg	tgacgtttag	6840
tattccaatt	tcttcaaaat	ttagttatgg	ataatgaaaa	tccccaattg	actgttcaat	6900
ttcttgtaa	atgcgcagat	ccccatggct	tcgatctcct	cctcagtcgc	gaccgttagc	6960
cggaccgccc	ctgctcaggc	caacatgggtg	gtcccgttca	ccggccttaa	gtccaacgcc	7020
gccttcccca	ccaccaagaa	ggctaacgac	ttctccaccc	ttcccagcaa	cggtggaaga	7080
gttcaatgta	tgacgggtgtg	gccggcctac	ggcaacaaga	agttcgagac	gctgtcgtac	7140
ctgccgccc	tgcttatggc	gcccaccgtg	atgatggcct	cgtcggccac	cgccgtcgct	7200
ccgttccagg	ggctcaagtc	caccgccagc	ctccccgtcg	cccgccgctc	ctccagaagc	7260
ctcggcaacg	tcagcaacgg	cggaaggatc	cggtgcatgg	ccggcgccga	ggagatcgctg	7320
ctgcagccca	tcaaggagat	ctccggcacc	gtcaagctgc	cggggtccaa	gtcgctttcc	7380
aaccggatcc	tcctactcgc	cgccctgtcc	gaggggacaa	cagtgggtga	taacctgctg	7440
aacagtgagg	atgtccacta	catgctcggg	gccttgagga	ctcttggtct	ctctgtcgaa	7500
gcggacaaag	ctgccaaaag	agctgtagtt	gttggtgtgtg	gtggaaagt	cccagttgag	7560
gatgctaaag	aggaagtgc	gctcttcttg	gggaatgctg	gaatcgcaat	gcggtccttg	7620
acagcagctg	ttactgctgc	tggtggaaat	gcaacttacg	tgcttgatgg	agtaccaaga	7680
atgagggaga	gaccatttgg	cgacttggtt	gtcggattga	agcagcttgg	tgcatatggt	7740
gattgtttcc	ttggcactga	ctgcccacct	gttcgtgtca	atggaatcgg	agggtacct	7800
ggtggcaagg	tcaagctgtc	tggtcccatc	agcagtcagt	acttgagtgc	cttgctgatg	7860
gctgtctcct	tggtctttgg	ggatgtggag	attgaaatca	ttgataaatt	aatctccatt	7920
ccgtacgtcg	aaatgacatt	gagattgatg	gagcgttttg	gtgtgaaagc	agagcattct	7980
gatagctggg	acagattcta	cattaagggg	ggtcaaaaat	acaagtcccc	taaaaatgcc	8040

tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg ctggtgctgc aattactgga	8100
gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc agggatgatgt gaagtttgct	8160
gaggtactgg agatgatggg agcgaagggtt acatggaccg agactagcgt aactgttact	8220
ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg cgattgatgt caacatgaac	8280
aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc tctttgccga tggcccgaca	8340
gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg agaggatggt tgcgatccgg	8400
acggagctaa ccaagctggg agcatctgtt gaggaagggc cggactactg catcatcacg	8460
ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg acgaccacag gatggcgatg	8520
gcttttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca tccgggaccc tgggtgcacc	8580
cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt tcgtcaagaa ttaagctcta	8640
gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg tttctcactt aagcgtctgc	8700
gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg gtagcgttct tgttatgtgt	8760
aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa atataaatcg aatcaagttt	8820
cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg tgaaaattgc ttcaattttg	8880
tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac ctcaaattctt cgaacattta	8940
tttctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg ttcctatgtc cgggaaagtt	9000
cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca cgacgtcgca ttggtacgga	9060
tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa ccgattttgg ttaaagtgt	9120
acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cgggtacaagt ttgattgagc aacttgatga	9180
caaacttcag aatttttggtt attgaatgaa aatcatagtc taatcgtaaa aaatgtacag	9240
aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt ccaatttatc atcgctttta	9300
cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaaacgcc gggcacgtgg gatcctctag	9360
cagatctggc cgccccaccg gtggggcata tggggccgcg gccgcgaatt cgagctcggt	9420
acctacctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt	9480
tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattgc ggccgcaatt cccgatctag	9540
taacatagat gacaccgcgc gcgataattt atcctagttt gcgcgctata ttttgttttc	9600
tatcgcgtat taaatgtata attgcgggac tctaatacata aaaaccatc tcataaataa	9660
cgtcatgcat tacatgttaa ttattacatg cttaacgtaa ttcaacagaa attatatgat	9720
aatcatcgca agaccggcaa caggattcaa tcttaagaaa ctttattgcc aaatgtttga	9780
acgatcgggg aaattcgtcg agtcaccctc ggccgggctt tttgacgctt aatcggcggt	9840
caatacacca cgacgcacct ggtcacgttc gatggactcg aacagcgcct tgaagttcca	9900
ctcgccaaac ccacgtcgc cttgvcgtg gatgaattcg aagaacaccg ggcccatcag	9960

ggtttccgag aagatctgca gcagcaggcg tttgtcgct tccacggaag atccgtccag 10020
 caggataccg cgtgcctgca gttgatccac cggctcgccg tggtcaggca ggcggccttc 10080
 gagcatttcg taataagtgt ctggcggcgc ggtcatgaag cgcattgccga ttttcttcaa 10140
 cgcgctccag gtcttgacca ggtcgctcgt gaggaacgcc acgtgctgga tgccttcgcc 10200
 gttgaactgc atcaggaact cttcgatctg ccccgcgccc ttggacgact cttcgttcag 10260
 cgggatgcgg atcatgccgt ccggcgccact catggccttg gaagtcaggc cgggtgtactc 10320
 gcccttgata tcgaagtaac gcgcttcacg gaagttgaac aatttctcgt agaagttggc 10380
 ccagtagacc atgcggccgc gatagacgtt gtgggtcagg tggtcgatga ctttgagacc 10440
 tgcaccgacc ggattgcgct ccacaccttc gaggtacacg aagtcgatgt cgtagatcga 10500
 gctgccttcg ccgaaacggt cgatcaggta caacggcgcg ccgccgatgc cttgatcgc 10560
 cggcaggttc aattccatcg gcccggtgtc aatatggatc ggctgggcgc cgagttccag 10620
 ggcgcggttg taggcctttt gcgagtcctt cacgcggaac gccatgccgc acaccgacgg 10680
 gccgtgttcg gccgcaaagt aggaggcgat gctgttgggc tcgttgttga ggatcaggtt 10740
 gatctcgccc tggcgggtaca ggtgcacgtt cttggaacgg tgggtcgca ctttggtgaa 10800
 gcccatgatc tcgaagatcg gctccagggt acccggcgtc ggcgacgca attcgatgaa 10860
 ttcaaagccc atcaggccca ttgggttttc gtatagatct gccatgcacc ggatccttcc 10920
 gccgttgctg acgttgccga ggcttctgga ggagcggcgg gcgacgggga ggctggcggg 10980
 ggacttgagc ccctggaacg gagcgacggc ggtggccgac gaggccatca tcacggtggg 11040
 cgccatagac agcggcggca ggtacgacag cgtctcgaac ttcttgttg ctaggcccgg 11100
 ccacacctgc atatattgaa ctcttcacc gttgctggga aggggtggaga agtcgtagc 11160
 cttcttggtg gtggggaagg cggcgttggga cttaggccg gtgaacggag ccacatggt 11220
 ggcctgagca ggggcgggtc ggctaacggt cgcgactgag gaggagatcg aagccatggc 11280
 tatcgttcgt aaatggtgaa aattttcaga aaattgctt tgctttaaaa gaaatgattt 11340
 aaattgctgc aatagaagta gaatgcttga ttgcttgaga ttcgtttgtt ttgtatatgt 11400
 tgtgttgaga attctagagt cgagagaaat tgatgtctgt agaagaagaa gaacggttaa 11460
 gagtagattt gggtagaaaa gatgtgaaat tgtttttata ggcaaagacg gagagtctat 11520
 tttttgagca atcagatcgc atattaaatc taacggctga gatatcgatc cgtgtgtaca 11580
 ataaaaatgat gtataaaccg tcgatctgtt ttaatcgacg gttcatatta gtgatccgcg 11640
 tgatggcagt gatagccact aagaatcgtc ttttgtttta catgtggcgc cacaaattag 11700
 ggtaatgaag cggcaatatt ttggaactcg gaaaataaaa ttgcgccatc acattatttg 11760
 aaaattttca catgctttta ttttaaaaac ccacgaatta caagttacaa ccgaaaaaga 11820

ttataaatat agtgatttat actaattttg tagtagctta atgtatatattg atactggaaa 11880
 aacaatgaca atcataatcg atccgtgtgt acaataaaat gatgtataaa ccgtcgatct 11940
 gttttaatcg acggttcata ttagtgatcc gcgtgatggc agtgatagcc actaagaatc 12000
 gtcttttgtt ttacatgtgg cgccacaaat tagggtaatg aagcggcaat attttggaac 12060
 tcggaaaata aaattgcgcc atcacattat ttgaaaattt tcacatgctt ttattttaaa 12120
 aaccacgaa ttacaagtta caaccgaaaa agatttataa tatagtattt tataactaatt 12180
 ttgtagtagc ttaatgtata ttgatactgg aaaaacaatg acaatcatat gttagtatta 12240
 tcaagttatc gtattgatat tgatattgga acatacaatg ggtattgcct tctttcgacc 12300
 ataaatatca ccaaatttac aaagtttgtg tataccaagt tatcaattgt aaatgggatg 12360
 tcaacatttt aatttccctt tgagaaacta tagaccacaa gaacacactt caatagataa 12420
 agtaactatt tacataagag gttttaaaat cacattaaca aaaataatta ccaaccggca 12480
 ctacaaaata caaacagagc acacgacatg tcaaagccac aagtaaattc gttgagtggg 12540
 ggtttcatta caattgtgtc acttgcagca caaactatct tgctctggga atcatctcag 12600
 catcaaagat catgctcact tcaggggaac ttagtgatc catgcctcga ctcatatttc 12660
 tcctcgacct gcaggcatgc aagctctaga gcggccgcca ccgcggtgga ggtactcgag 12720
 tcgcgacgta cgttcgaaca attggtttta aaagcttgca tgcctgcagg tcgaggagaa 12780
 atatgagtcg aggcattgat aactaagtt cccctgaagt gagcatgatc tttgatgctg 12840
 agatgattcc cagagcaaga tagtttgtgc tgcaagtgc acaattgtaa tgaaaccacc 12900
 actcaacgaa ttacttgtg gctttgacat gtcgtgtgct ctgtttgtat ttgtgagtgc 12960
 cggttggtaa ttatttttgt taatgtgatt ttaaaacctc ttatgtaaat agttacttta 13020
 tctattgaag tgtgttcttg tggcttatag tttctcaaag ggaaattaaa atgttgacat 13080
 cccatttaca attgataact tggatatac aaactttgta aatttggtga tatttatggg 13140
 cgaaagaagg caatacccat tgtatgttcc aatatcaata tcaatacgat aacttgataa 13200
 tactaacata tgattgtcat tgtttttcca gtatcaatat acattaagct actacaaaat 13260
 tagtataaat cactatatta taaatctttt tcggttgtaa cttgtaattc gtgggttttt 13320
 aaaataaaag catgtgaaaa ttttcaaata atgtgatggc gcaattttat tttccgagtt 13380
 ccaaaatatt gccgcttcat taccctaatt tgtggcgcca catgtaaaac aaaagacgat 13440
 tcttagtggc tatcactgcc atcacgcgga tcactaatat gaaccgtcga ttaaaacaga 13500
 tcgacggttt atacatcatt ttattgtaca cacggatcga tatctcagcc gttagattta 13560
 atatgcgatc tgattgtcga aaaaatagac tctccgtctt tgcctataaa aacaatttca 13620
 catctttctc acccaaactc actcttaacc gttcttcttc ttctacagac atcaatttct 13680
 ctcgactcta gaggatccaa gcttatcgat ttcgaacccc tcaggcgaag aacagggtatg 13740

atttgtttgt aattagatca ggggttttagg tctttccatt actttttaat gttttttctg 13800
 ttactgtctc cgcgatctga ttttacgaca atagagtttc gggttttgtc ccattccagt 13860
 ttgaaaataa aggtccgtct ttttaagttg ctggatcgat aaacctgtga agattgagtc 13920
 tagtcgattt attggatgat ccattcttca tcgttttttt cttgcttcga agttctgtat 13980
 aaccagattt gtctgtgtgc gattgtcatt acctagccgt gtatcgagaa ctagggtttt 14040
 cgagtcaatt ttgccccctt tggttatatc tggttcgata acgattcatc tggattaggg 14100
 ttttaagtgg tgacgttttag tattccaatt tcttcaaaat ttagttatgg ataataaaaa 14160
 tcccccaattg actgttcaat ttcttgtaa atgcgcagat ccccatggct tcgatctcct 14220
 cctcagtcgc gaccgttagc cggaccgccc ctgctcaggc caacatgggtg gctccgttca 14280
 ccggccttaa gtccaacgcc gccttcccca ccaccaagaa ggctaacgac ttctccaccc 14340
 ttcccagcaa cgggtgaaga gttcaatgta tgcaggtgtg gccggcctac ggcaacaaga 14400
 agttcgagac gctgtcgtac ctgccgccgc tgtctatggc gccaccgtg atgatggcct 14460
 cgtcggccac cgccgtcgct ccgttccagg ggtcaagtc caccgccagc ctccccgtcg 14520
 cccgccgtc ctccagaagc ctccgcaacg tcagcaacgg cggaaggatc cgggtgcatgg 14580
 ccggcgccga ggagatcgtg ctgcagccca tcaaggagat ctccggcacc gtcaagctgc 14640
 cgggggtccaa gtcgctttcc aaccggatcc tcctactcgc cgccctgtcc gaggggacaa 14700
 cagtggttga taacctgctg aacagtgagg atgtccacta catgctcggg gccttgagga 14760
 ctcttggtct ctctgtcgaa gcggacaaag ctgccaaaag agctgtagtt gttggctgtg 14820
 gtggaaagtt cccagttgag gatgctaaag aggaagtgc gctcttcttg gggaatgctg 14880
 gaatcgcaat gcggtccttg acagcagctg ttactgctgc tgggtggaaat gcaacttacg 14940
 tgcttgatgg agtaccaaga atgagggaga gaccattgg cgacttggtt gtcggattga 15000
 agcagcttgg tgcagatgtt gattgtttcc ttggcactga ctgccacct gttcgtgtca 15060
 atggaatcgg agggctacct ggtggcaagg tcaagctgtc tggctccatc agcagtcagt 15120
 acttgagtgc cttgctgatg gctgctcctt tggctcttgg ggatgtggag attgaaatca 15180
 ttgataaatt aatctccatt ccgtacgtcg aaatgacatt gagattgatg gagcgttttg 15240
 gtgtgaaagc agagcattct gatagctggg acagattcta cattaaggga ggtcaaaaat 15300
 acaagtcccc taaaaatgcc tatgttgaag gtgatgcctc aagcgcaagc tatttcttgg 15360
 ctggtgctgc aattactgga gggactgtga ctgtggaagg ttgtggcacc accagtttgc 15420
 agggatgatgt gaagtttgct gaggtactgg agatgatggg agcgaagggt acatggaccg 15480
 agactagcgt aactgttact ggcccaccgc gggagccatt tgggaggaaa cacctcaagg 15540
 cgattgatgt caacatgaac aagatgcctg atgtcgccat gactcttgct gtggttgccc 15600

tctttgccga tggcccgaca gccatcagag acgtggcttc ctggagagta aaggagaccg 15660
agaggatggg tgcgatccgg acggagctaa ccaagctggg agcatctgtt gaggaagggc 15720
cggactactg catcatcacg ccgccggaga agctgaacgt gacggcgatc gacacgtacg 15780
acgaccacag gatggcgatg gctttctccc ttgccgcctg tgccgaggtc cccgtcacca 15840
tccggggacc tgggtgcacc cggaagacct tccccgacta cttcgatgtg ctgagcactt 15900
tcgtcaagaa ttaagctcta gaactagtgg atccccgat ccgcgtttgt gttttctggg 15960
tttctcactt aagcgtctgc gttttacttt tgtattgggt ttggcgttta gtagtttgcg 16020
gtagcgttct tgttatgtgt aattacgctt tttcttcttg cttcagcagt ttcggttgaa 16080
atataaatcg aatcaagttt cactttatca gcgttgtttt aaattttggc attaaattgg 16140
tgaaaattgc ttcaattttg tatctaaata gaagagacaa catgaaattc gacttttgac 16200
ctcaaactct cgaacattta tttctgatt tcacgatgga tgaggataac gaaagggcgg 16260
ttcctatgtc cgggaaagtt cccgtagaag acaatgagca aagctactga aacgcggaca 16320
cgacgtcgca ttggtacgga tatgagttaa accgactcaa ttcctttatt aagacataaa 16380
ccgattttgg ttaaagtgtg acagtgagct gatataaaac cgaaacaaac cgttacaagt 16440
ttgattgagc aacttgatga caaacttcag aattttgggt attgaatgaa aatcatagtc 16500
taatcgtaaa aaatgtacag aagaaaagct agagcagaac aaagattcta tattctgggt 16560
ccaatttatc atcgctttta cgtccctcag atttgatcgg gctgcaggaa ttaatgtggg 16620
tcatccgtct ttttggtaat gcggtcatca atacgtgcct caaagattgc caaatagatt 16680
aatgtgggtc atctccctat atgttttgct tgttggtttt tgctatcaca tgtttattgc 16740
tccaaactaa ttataataaa atgactttca aatgattggg gttgacattc ttttcaaatt 16800
gttcgctgaa gaaaagataa tctcgaggcc ttgatttggt aatgctttca ttaataaata 16860
aataaaataa ctctttccaa atttcaattc atgcttttat attgtgtggg tcatcctcat 16920
cttatgtcac tattatcatt tcatgtttga gactttactt ggccatattt gagaagacct 16980
tcttcattat aggcaatttt atctccacaa taatataaga gaatatcttg aattaataat 17040
tattgaggat atattatagg gttctatgtg gaactaaaga catgggtacc ccattaagag 17100
agagtataga ggaattactt ttatttgcca cgaggcgacg cgacttgat ttattttgga 17160
attgtacttt tgcgtgagca gtgtggctct atgttggggc ctccacttgt tgggtgttta 17220
tatatgtgaa aggaggatga gggatgatgt tcatttcttt gcattatttt tgttattcgc 17280
gcgaatgata tatgccctgt ttttgaagat tgatagggaa gtccatatat aggaattgaa 17340
gtgtcaaaag ggtgtgagta tgtgctatga taatcaccca attaatgtac atctggtgtg 17400
gtgtttgaat ttgtaggtca ttaattaata ttcctcttgg tgaagtttgg agttcttttg 17460
caattacaat tctgttttgt aagtgattat gatggacttt tagatgtttc tcaaacagta 17520

ggtgtaaaga aaaatgggcc ctggtatgaa aatttgtttt cactctttct cattcatatc 17580
 tttaaaaaaa gaatgataat ttgtaataa aaataaaaaa atattaaata ttttctcaaa 17640
 tcaaacaacc tttatttttt atgccaacaa taattttggt aaagatggag atttcaatta 17700
 ttatataaga gttcattata gttgaaaatt gaatgaatgt atatgtttac gttttttgtc 17760
 tcaagtgaaa ctaagatcaa atattcatat ctattgagct ggtctt 17806

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SHA130

<400> 12
 ctatattctg gttccaattt atc 23

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> nhân tạo

<220>
 <223> đoạn môi SMP178

<400> 13
 tgaggcacgt attgatgacc 20