



(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)



1-0029088

(51)⁷ C12N 15/29; C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2017-03351

(22) 24/05/2007

(62) 1-2008-03152

(86) PCT/US2007/069662 24/05/2007

(87) WO2007/140256 06/12/2007

(30) 60/808,834 26/05/2006 US

(45) 25/08/2021 401

(43) 25/11/2009 260A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY, LLC (US)

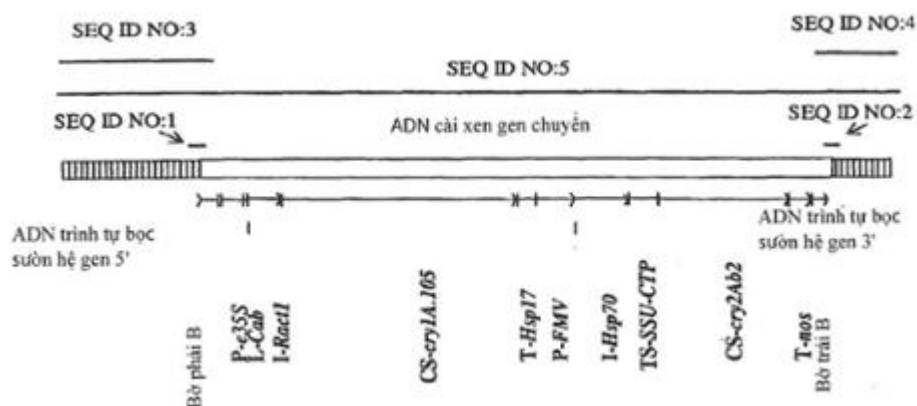
800 North Lindbergh Blvd, St. Louis, MO 63167, United States of America

(72) ANDERSON, Heather (US); DOUGLAS, Jennifer (US); GROAT, Jeanna (US); JOHNSON, Scott (US); KELLY, Rebecca (US); KORTE, John (US); RICE, James (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP CHỨA TRÌNH TỰ NUCLEOTIT

(57) Sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit, trong đó phân tử ADN này là từ sự kiện ngô MON89034.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sự kiện ngô chuyển gen MON89034 và các bộ phận của cây và hạt của nó. Sự kiện ngô này có khả năng kháng lại sự phá hoại của côn trùng thuộc bộ cánh vảy Lepidopteran. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sử dụng cây và hạt chứa ADN là dấu hiệu chẩn đoán về sự có mặt của sự kiện chuyển gen khi thăm dò sự có mặt của trình tự nucleotit liên quan đến sự kiện chuyển gen này, và phương pháp phát hiện sự có mặt của sự kiện ngô này trong mẫu sinh học bằng cách phát hiện trình tự nucleotit đặc hiệu mà là duy nhất đối với sự kiện chuyển gen này. Sáng chế đề xuất trình tự nucleotit mà là duy nhất đối với sự kiện này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến giống cây ngô chuyển gen (*Zea mays*) có tính kháng côn trùng thuộc bộ cánh vảy Lepidopteran, trong bản mô tả này được gọi là sự kiện MON89034, và các trình tự ADN duy nhất mà sự có mặt của nó, khi được phát hiện trong mẫu hoặc giống ngô bất kỳ, là dấu hiệu chẩn đoán về sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu hoặc giống này, và còn đề cập đến việc phát hiện gen chuyển/vùng cài xen thuộc hệ gen ở ngô MON89034, và thể hệ con và hạt từ nó.

Cây ngô thuộc sự kiện MON89034 đặc biệt có tính kháng côn trùng thuộc bộ cánh vảy như sâu cắn gié mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục thân ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu xanh hại ngô (*Helicoverpa zea*), sâu đục thân ngô Tây Nam (*Diatraea grandiosella*), và sâu cắn rễ đen (*Agrotis ipsilon*) và các loại tương tự, tất cả đều là những côn trùng gây hại quan trọng trong nông nghiệp.

Ngô là cây ngũ cốc quan trọng và là nguồn lương thực chủ yếu ở nhiều nơi trên thế giới. Các phương pháp công nghệ sinh học đã được áp dụng cho ngô nhằm cải thiện những tính trạng nông học và chất lượng của sản phẩm. Một trong những tính trạng nông học này là tính kháng côn trùng, ví dụ, tính kháng các loài cánh vảy và cánh cứng được tạo ra theo phương pháp di truyền ở các cây ngô được tạo ra nhờ kỹ thuật di truyền để chứa một hoặc nhiều gen mã hoá các chất diệt côn trùng (xem ví dụ, WO 2004/020636, Patent Mỹ 6,489,542 và Patent Mỹ 6,620,988). Có lợi khi phát hiện sự có mặt của một sự kiện chuyển gen cụ thể trong mẫu sinh học để xác định liệu một hoặc nhiều thể hệ con của cây lai chéo hữu tính có chứa vật liệu chuyển gen hay

không. Ví dụ, việc phát hiện sự kiện này trong mẫu là quan trọng nhằm đăng ký, thiết lập và duy trì các tiêu chuẩn vệ sinh, quan trọng để phù hợp với các cơ quan quản lý, để phù hợp với các tiêu chuẩn về thành phần thực phẩm, để dùng trong tranh tụng khi thiết lập một hoặc nhiều cá thể hoặc thực thể cụ thể bằng cách sử dụng dạng cụ thể này mà không cần sự cho phép của chủ sở hữu hoặc sự cho phép của các sáng chế bất kỳ nhằm vào sự kiện chuyển gen này, và để đảm bảo sự tuân thủ các quy định của chính quyền và/hoặc luật pháp.

Ngoài ra, các phương pháp cho phép phát hiện một thực vật cụ thể sẽ có ích khi tuân theo các quy định đòi hỏi việc phê chuẩn và dán nhãn thực phẩm có nguồn gốc từ thực vật tái tổ hợp trước khi đưa ra thị trường. Các cá thể hoặc thực thể bị cho là có mẫu mang một sự kiện chuyển gen cũng mong muốn có được các phương pháp tin cậy để phát hiện sự có mặt của các gen chuyển trong mẫu để họ có khả năng lợi dụng việc kinh doanh của họ, khi sự vắng mặt của gen chuyển trong sản phẩm của họ là có lợi.

Ngoài những lợi ích đó, côn trùng có thể có được tính kháng đối với các thực vật chỉ biểu hiện một nội độc tố δ từ *B. thuringiensis*. Tính kháng này, khi trở nên phổ biến, sẽ làm hạn chế rõ rệt giá trị thương mại của chất mầm chứa các gen Bt đơn lẻ.

Một cách có thể sử dụng để làm gia tăng hiệu quả của các chất diệt côn trùng được tạo ra nhờ thực vật chuyển gen và nhằm phòng trừ côn trùng gây hại đích và đồng thời làm giảm khả năng xuất hiện loài côn trùng gây hại kháng lại các chất diệt côn trùng này là đảm bảo cho các cây chuyển gen này biểu hiện các chất diệt côn trùng ở mức cao, như nội độc tố δ của *Bacillus thuringiensis* (McGaughey và Whalon (1992), Science 258:1451-55; Roush (1994) Biocontrol. Sci. Technol.. 4:501-516). Ngoài ra, việc có được kho các gen diệt côn trùng chống lại hữu hiệu các nhóm côn trùng gây hại và thể hiện tác dụng của chúng qua các phương thức tác dụng khác nhau có thể bảo vệ khỏi sự phát triển tính kháng. Sự khởi phát tính kháng về cơ bản có thể được cản trở nhờ việc tạo ra cây trồng biểu hiện hai hoặc nhiều hơn hai hoạt tính diệt côn trùng có cùng độc tính đối với cùng một loài côn trùng. Một cách để đạt được hai phương thức tác dụng như vậy có thể là tạo ra thực vật biểu hiện độc tố gen Bt đối với một loài côn trùng cụ thể cùng với một dsARN được tạo ra nhằm mục đích hướng tới sự ức chế một gen thiết yếu của cùng loài côn trùng mà độc tố Bt nhằm vào, dsARN gây ra đáp ứng ARNi khi được loài gây hại đích ăn vào, tạo ra phương thức đối với dạng dư thừa mà côn trùng phát triển tính kháng đối với dsARN hoặc đối với gen Bt.

Theo một cách khác, sự biểu hiện đồng thời hai hoặc nhiều hơn hai độc tố diệt côn trùng ở thực vật có tính độc đối với cùng một loài côn trùng nhưng mỗi loại độc tố có một phương thức thực hiện hoạt tính tiêu diệt khác nhau, đặc biệt là khi cả hai đều được biểu hiện ở mức cao, tạo ra cách khống chế tính kháng hữu hiệu. Ví dụ về thuốc diệt côn trùng có thể sử dụng trong hỗn hợp như vậy bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các độc tố Bt, các protein diệt côn trùng từ *Xenorhabdus* sp. hoặc *Photorhabdus* sp., protein patatin đã được loại dị ứng và khử glycosyl và/hoặc permutein, lectin thực vật, và thuốc diệt côn trùng tương tự.

Đã biết rằng sự biểu hiện gen ngoại lai trên thực vật có thể bị ảnh hưởng bởi vị trí nhiễm sắc thể, có thể là do cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ, chất dị nhiễm sắc) hoặc do ở gần yếu tố điều hoà phiên mã (ví dụ, yếu tố tăng cường) gần với vị trí đích (Weising *et al*, 1988). Vì lý do này, thường cần phải sàng lọc số lượng lớn các sự kiện để nhận biết sự kiện đặc trưng bởi sự biểu hiện tối ưu của gen quan tâm được đưa vào.

Mặc dù vậy, với hàng tá hoặc thậm chí là hàng trăm sự kiện chuyển gen khác nhau trong tay, việc nhận biết một sự kiện chuyển gen đơn lẻ có mức biểu hiện của ít nhất hai độc tố hoặc chất diệt côn trùng khác nhau là tối ưu và không có các khiếm khuyết không mong muốn về mặt nông học hoặc tác dụng gây độc đối với thực vật, do sự cài xen vào một số vùng thiết yếu hoặc một phần vùng thiết yếu của hệ gen thực vật, hoặc do tác dụng gây độc được tạo ra bởi các mức biểu hiện của gen chuyển chưa chắc là đã thành công. Ví dụ, đã quan sát được sự thay đổi trong khoảng rộng về mức biểu hiện của gen được đưa vào trong các dạng thực vật và các vi sinh vật khác. Cũng có thể có sự khác biệt về kiểu biểu hiện trong không gian hoặc theo thời gian, ví dụ sự khác biệt về sự biểu hiện tương đối của gen chuyển trong các mô thực vật khác nhau, mà nó có thể không tương ứng với kiểu mong đợi từ yếu tố điều hoà phiên mã có mặt trong cấu trúc gen được đưa vào. Vì lý do này, người ta thường tạo ra hàng trăm đến hàng ngàn sự kiện khác nhau và sàng lọc các sự kiện này để lấy sự kiện duy nhất có mức và kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn nhằm mục đích thương mại. Một sự kiện có mức hoặc kiểu biểu hiện gen chuyển mong muốn có thể sử dụng để nhập gen chuyển vào nền di truyền khác bằng cách lai chéo xa hữu tính có sử dụng các phương pháp nhân giống thông thường. Thế hệ con của cây lai này vẫn có những đặc tính biểu hiện gen của thể biến nạp gốc. Chiến lược này được sử dụng để đảm bảo sự biểu hiện gen đáng tin cậy ở một số loại thích ứng tốt với các điều kiện sinh trưởng cục bộ.

Có thể phát hiện sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp phát hiện axit nucleic bất kỳ đã biết như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc lai ADN bằng cách sử dụng đoạn dò axit nucleic. Các phương pháp phát hiện này thường tập trung vào các yếu tố di truyền thường dùng, như gen khởi đầu, gen kết thúc, gen đánh dấu, hoặc thậm chí là trình tự mã hóa mã hoá protein hoặc dsARN quan tâm được biểu hiện từ gen chuyển, v.v.. Kết quả là, các phương pháp như vậy có thể không được sử dụng để phân biệt giữa các sự kiện khác nhau, đặc biệt là các sự kiện được tạo ra bằng cách sử dụng cùng một cấu trúc ADN, trừ khi trình tự của ADN nhiễm sắc thể liên kết với ADN được cài xen (“ADN bọc sườn”) là đã biết. Tùy thuộc vào phương pháp được dùng để đưa gen chuyển (các gen chuyển) vào hệ gen thực vật, có thể quan sát thấy các tác dụng khác thường hoặc hiếm khi xảy ra, thường làm phức tạp hóa việc xác định trình tự hệ gen thực vật bọc sườn ADN chuyển gen được dự định đưa vào thực vật. Trong nhiều trường hợp, sự sắp xếp lại của ADN được cài xen, sự sắp xếp lại của ADN hệ gen bọc sườn, hoặc sự sắp xếp lại của cả ADN được cài xen và ADN hệ gen bọc sườn là phổ biến, và làm phức tạp việc phân tích dạng cài xen được đánh giá. Vì vậy, có lợi khi có được một phương pháp để chọn lọc, nhận biết, và đảm bảo độ tinh khiết và các đặc tính của một sự kiện chuyển gen cụ thể trong mẫu, và cách duy nhất để thực hiện phương pháp này là nhận biết một hoặc nhiều trình tự khác thường chỉ liên quan đến sự kiện chuyển gen mong muốn, và sự có mặt của các trình tự như vậy trong mẫu sinh học chứa ADN của loài thực vật mà ADN chuyển gen được cài xen vào đó để thu được sự gia tăng về dạng là công cụ chẩn đoán dạng này trong mẫu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến cây ngô chuyển gen MON89034 và thế hệ con của nó không thể phân biệt được với sự kiện ngô MON89034 (tới mức mà chúng cũng chứa ít nhất một alen tương tự ADN chuyển gen được cài xen) có hạt được nộp lưu ngày 28 tháng 3 năm 2006 tại American Type Culture Collection (ATCC) với số hiệu nộp lưu PTA-7455. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thế hệ con, hoặc hạt, hoặc các bộ phận có thể tái sinh của cây và hạt của sự kiện ngô MON89034 chứa polynucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, và SEQ ID NO:5. Sáng chế còn bao gồm các bộ phận của cây ngô thuộc sự kiện MON89034 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở phần hoa, nõn, hoa, chồi, rễ, thân, râu, cò, bắp, và lá, miễn là các bộ phận này chứa ít nhất một polynucleotit nêu trên. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm mới được

tạo ra nhờ kỹ thuật di truyền được chứa trong hệ gen của MON89034 và các sản phẩm từ MON89034 như bột thô, bột mịn, dầu, bột nhão, và sinh khối trong lĩnh vực cây ngô tương ứng với sự kiện MON89034.

Sáng chế đề xuất cây ngô kháng côn trùng có tất cả các đặc tính sinh lý và hình thái của cây ngô thuộc sự kiện MON89034.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp để phát hiện sự có mặt của gen chuyển/vùng cài xen trong hệ gen từ cây ngô mới có tên gọi MON89034. Các trình tự ADN được đề xuất bao gồm ít nhất một trình tự nối của MON89034 được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1 (nằm ở các vị trí từ 2051 đến 2071 trong SEQ ID NO: 5) và SEQ ID NO:2 (nằm ở các vị trí từ 11295 đến 11314) và các trình tự bổ trợ của nó; trong đó trình tự nối kéo dài từ mỗi nối giữa ADN khác loài được cài xen vào trong hệ gen và ADN từ tế bào ngô bọc sườn vị trí cài xen này và là các dấu hiệu chẩn đoán đối với sự kiện này (Hình 1). Ngô sự kiện MON89034 và hạt chứa các phân tử ADN này là một khía cạnh của sáng chế.

Các trình tự ADN bao gồm gen chuyển/vùng cài xen trong hệ gen mới, SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4 (Hình 1) từ sự kiện MON89034 là các khía cạnh của sáng chế. Cây ngô và hạt chứa các phân tử này cũng là những khía cạnh của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hai phân tử ADN để dùng trong phương pháp phát hiện ADN, trong đó phân tử ADN thứ nhất bao gồm ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 polynucleotit liên kế thuộc phần bất kỳ của vùng gen chuyển của phân tử ADN có trình tự SEQ ID NO:3 và phân tử ADN thứ hai có chiều dài tương tự thuộc phần bất kỳ của vùng ADN hệ gen ngô bọc sườn đầu 5' có trình tự SEQ ID NO:3, trong đó các phân tử ADN này khi được sử dụng cùng nhau có thể dùng làm các đoạn mồi ADN trong phương pháp khuếch đại ADN tạo ra đơn vị siêu sao chép. Đơn vị siêu sao chép được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn mồi ADN này trong phương pháp khuếch đại ADN là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự kiện ngô MON 89304 khi đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO:1. Đơn vị siêu sao chép bất kỳ được tạo ra bằng các đoạn mồi ADN tương đồng hoặc bổ trợ cho phần bất kỳ của SEQ ID NO:3 và đơn vị siêu sao chép bất kỳ chứa SEQ ID NO:1 là một khía cạnh của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hai phân tử ADN để dùng trong phương pháp phát hiện ADN, trong đó phân tử ADN thứ nhất bao gồm ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 polynucleotit liên kế thuộc phần bất kỳ của vùng gen chuyển của phân

từ ADN có trình tự SEQ ID NO:4 và phân tử ADN có chiều dài tương tự thuộc phần bất kỳ của ADN hệ gen ngô bọc sừng đầu 3' có trình tự SEQ ID NO:4, trong đó các phân tử ADN này có thể dùng làm các đoạn môi ADN trong phương pháp khuếch đại ADN. Đơn vị siêu sao chép được tạo ra bằng cách sử dụng các đoạn môi ADN này trong phương pháp khuếch đại ADN là các dấu hiệu chẩn đoán đối với sự kiện ngô MON 89304 khi đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO:2. Các đơn vị siêu sao chép bất kỳ được tạo ra bằng các đoạn môi ADN tương đồng hoặc bổ trợ cho phần bất kỳ của SEQ ID NO:4 và đơn vị siêu sao chép bất kỳ chứa SEQ ID NO:2 là một khía cạnh của sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN tương ứng với sự kiện ngô MON89034 trong mẫu. Các phương pháp này bao gồm: (a) cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với bộ đoạn môi mà khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ sự kiện ngô MON89034, tạo ra đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự kiện ngô MON89034; (b) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, bằng cách đó tạo ra đơn vị siêu sao chép; và (c) phát hiện đơn vị siêu sao chép trong đó đơn vị siêu sao chép này chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2.

Cây ngô, hoặc hạt, hoặc sản phẩm có nguồn gốc từ cây hoặc hạt MON89034 trong đó ADN hệ gen chứa phân tử ADN về cơ bản bao gồm SEQ ID NO:5 và trình tự bổ trợ của nó. Cây ngô, hoặc hạt, hoặc sản phẩm có nguồn gốc từ cây hoặc hạt MON89034, trong đó ADN hệ gen khi được phân lập từ cây ngô, hoặc hạt, hoặc sản phẩm chứa phân tử ADN kết hợp các nucleotit từ 2061 đến 11305 của SEQ ID NO:5 và trình tự bổ trợ của nó.

Cây ngô, hoặc hạt, hoặc sản phẩm có nguồn gốc từ cây hoặc hạt MON89034, trong đó ADN hệ gen khi được phân lập từ cây ngô, hoặc hạt, hoặc sản phẩm tạo ra đơn vị siêu sao chép trong phương pháp khuếch đại ADN, trong đó các phân tử đoạn môi ADN SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7 được sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN tương ứng với sự kiện MON89034 trong mẫu, các phương pháp này bao gồm: (a) cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với đoạn dò lai với ADN hệ gen từ sự kiện ngô MON89034 trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt và không lai với cây ngô đối chứng trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt; (b) đặt mẫu và đoạn dò trong các điều

kiện lai hóa nghiêm ngặt; và (c) phát hiện sự lai hóa giữa đoạn dò này với ADN sự kiện ngô MON89034 trong đó đoạn dò này chứa SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định sự tiếp hợp giao tử của thể hệ con của sự kiện ngô MON89034 bao gồm: (a) cho mẫu chứa ADN ngô tiếp xúc với bộ đoạn mồi bao gồm SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843(SEQ ID NO:7), SQ6523(SEQ ID NO:10), SQ6524(SEQ ID NO:11), PB880 (SEQ ID NO:14) và PB2931 (SEQ ID NO:15) khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ sự kiện ngô MON89034, tạo ra đơn vị siêu sao chép thứ nhất là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự kiện ngô MON89034 và (b) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, bằng cách đó tạo ra đơn vị siêu sao chép thứ nhất; và (c) phát hiện đơn vị siêu sao chép thứ nhất; và (d) cho mẫu chứa ADN ngô tiếp xúc với bộ đoạn mồi, mà khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ cây ngô tạo ra đơn vị siêu sao chép thứ hai bao gồm ADN hệ gen ngô nguyên thể tương đồng với vùng cài xen gen chuyển trong hệ gen ngô được nhận biết như là sự kiện ngô MON89034; và (e) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, bằng cách đó tạo ra đơn vị siêu sao chép thứ hai và (f) phát hiện đơn vị siêu sao chép thứ hai; và (g) so sánh các đơn vị siêu sao chép thứ nhất và thứ hai trong mẫu, trong đó sự có mặt của đồng thời hai đơn vị siêu sao chép cho thấy mẫu này là dị hợp tử đối với sự cài xen gen chuyển.

Một khía cạnh của sáng chế là đưa lượng hữu hiệu có tác dụng diệt côn trùng của sự kiện ngô MON89034 vào thức ăn của côn trùng gây hại thuộc bộ cánh vảy.

Một khía cạnh khác của sáng chế là đề xuất hỗn hợp hoặc mẫu sinh học ở dạng sản phẩm hoặc thực phẩm có nguồn gốc từ sự kiện ngô MON89034, sản phẩm hoặc thực phẩm này bao gồm bắp ngô, ngô bóc vỏ, râu ngô, phần ngô, ngô được làm vỡ, bột ngô thô, ngô được nghiền, bột ngô mịn, dầu ngô, tinh bột ngô, dịch chiết lõi ngô, malt ngô, đường từ ngô, sirô ngô, margarin được sản xuất từ dầu ngô, dầu ngô chưa bão hoà, dầu ngô bão hoà, bỏng ngũ cốc, bỏng ngô, etanol và/hoặc rượu được sản xuất từ ngô hoặc các sản phẩm ngô chứa dấu hiệu chẩn đoán ADN đối với sự kiện ngô MON89034, sản phẩm phụ giàu protein của quá trình sản xuất etanol từ ngô (distillers dry goods solids - DDGS) được sản xuất bằng cách lên men sự kiện ngô này, và thức ăn cho động vật chứa DDGS và/hoặc ngô này, cho dù là thực phẩm nguyên, được làm vỡ, được nghiền, hoặc đã chế biến, mỹ phẩm, và chất độn trong đó tìm thấy một lượng polynucleotit có thể phát hiện được là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của sự

kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học này. Một cách khác để sử dụng ngô làm thực phẩm là tạo ra ngô ở các dạng hạt khác nhau để ăn, như ngô nguyên hạt, ngô được làm vỡ, ngô được nghiền, và hỗn hợp gồm các dạng nêu trên với mì, bơ, hạt kê, hướng dương, yến mạch, lúa mì, gạo, đậu, và các hạt tương tự. Lượng trình tự nucleotit có thể phát hiện trong sản phẩm hoặc thực phẩm như vậy, như nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2, hoặc trình tự bổ trợ của nó, là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN sự kiện chuyển gen MON89034 trong mẫu, và vì vậy, là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của các tế bào sự kiện chuyển gen do có chứa ADN trong mẫu.

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

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1. Cấu tạo của đoạn cài xen gen chuyển có mặt trong hệ gen của sự kiện ngô chuyển gen MON89034. Thanh rỗng ở giữa hoặc có màu trắng là ADN được cài xen. Bên dưới thanh màu trắng này là sơ đồ miêu tả các yếu tố khác nhau thuộc ADN được cài xen này. Các đầu của ADN được cài xen được đánh số một cách tùy tiện là 5' (ở phía trái của Hình) và 3' (ở phía phải của Hình). Các trình tự hoặc các đoạn bờ phải và bờ trái (Right Border and Left Border) được gắn nhãn bên dưới mỗi đầu của sơ đồ minh họa các yếu tố khác thuộc ADN được cài xen này. Các yếu tố được gắn nhãn trong cấu trúc biểu hiện thuộc ADN được cài xen này là, theo thứ tự liên tiếp bắt đầu từ bờ phải: gen khởi đầu e35S, đoạn dẫn chưa dịch mã CAB từ lúa mì, intron actin của lúa, trình tự mã hóa cho Cry1A.105, trình tự đầu tận cùng 3' và adenyl hóa HSP17 ở lúa mì, gen khởi đầu FMV, intron hsp70, trình tự mã hóa peptit hướng lực lập cấu trúc tiểu đơn vị nhỏ rubisco, trình tự mã hóa Cry2Ab, trình tự tín hiệu đầu tận cùng 3' và adenyl hóa, và tiếp theo là bờ trái. Các thanh được gạch bóng ở đầu của thành rỗng ở giữa hoặc thanh màu trắng tương ứng với các trình tự bọc sườn hệ gen ngô 5' và 3' được đánh số tùy tiện. Đường màu đen dài nhất ở trên thanh được gạch bóng và thanh rỗng hoặc màu trắng là SEQ ID NO:5 (trình tự với chiều dài đầy đủ được biểu thị bởi hình mô tả trình tự bọc sườn 5', trình tự ADN được cài xen, và trình tự bọc sườn 3'). Các đường màu đen ngắn hơn nằm trên và dưới đường màu đen được đánh dấu SEQ ID NO:5 là các vị trí gần đúng trong SEQ ID NO:5 trong đó mỗi trình tự được gắn nhãn cụ thể có thể được phát hiện (nghĩa là, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, và SEQ ID NO:4). SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2, và trình tự

bất kỳ có nguồn gốc từ sự kiện ngô MON89034 chứa SEQ ID NO:1 và/hoặc SEQ ID NO:2, là dấu hiệu chẩn đoán đối với ADN sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa và phương pháp sau được đề xuất để xác định sáng chế rõ hơn và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này trong việc thực hiện sáng chế. Trừ khi được chú thích theo cách khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Định nghĩa của các thuật ngữ chung trong sinh học phân tử cũng có thể tìm thấy trong Rieger et al., Glossary of Genetics: Classical and Molecular, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; và Lewin, Genes V, Oxford University Press: New York, 1994.

Được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngô” có nghĩa là *Zea mays* hoặc ngô và bao gồm tất cả các giống cây có thể được nhân giống với ngô, kể cả các loài ngô dại.

Được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa “bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở”.

“Sự kiện” chuyển gen được tạo ra bằng cách biến nạp các tế bào thực vật với ADN khác loài, ví dụ cấu trúc axit nucleic chứa gen chuyển quan tâm, tái sinh quần thể thực vật tạo thành bằng cách cài xen gen chuyển vào hệ gen của thực vật, và chọn thực vật cụ thể đặc trưng bởi việc cài xen vào vị trí cụ thể trong hệ gen. Thuật ngữ “sự kiện” dùng để chỉ thể biến nạp gốc và thế hệ con của thể biến nạp này chứa ADN khác loài. Thuật ngữ “sự kiện” cũng được dùng để chỉ thế hệ con được tạo ra bằng cách lai chéo hữu tính giữa thể biến nạp và một giống khác chứa ADN khác loài. Ngay cả sau khi lai ngược lặp lại với một cây mẹ theo định kỳ, ADN được cài xen và ADN bọc sườn từ cây mẹ đã biến nạp có mặt trong thế hệ con của cây lai ở cùng một vị trí trên nhiễm sắc thể. Thuật ngữ “sự kiện” cũng được dùng để chỉ ADN từ thể biến nạp gốc bao gồm ADN được cài xen và trình tự hệ gen bọc sườn nằm liền kề ngay với ADN được cài xen mà mong đợi được chuyển vào thế hệ con nhận ADN được cài xen chứa gen chuyển quan tâm nhờ lai chéo hữu tính giữa một dòng bố mẹ chứa ADN được cài xen (ví dụ, thể biến nạp gốc và thế hệ con được tạo ra do sự tự thụ phấn) và dòng bố mẹ không chứa ADN được cài xen. Phần mô tả đề cập đến ADN của sự kiện

MON89034, tế bào thực vật, mô, hạt và sản phẩm chế biến có nguồn gốc từ MON89034.

Cũng cần phải hiểu rằng hai cây chuyển gen khác nhau cũng có thể được ghép đôi với nhau để tạo ra cây con chứa hai gen ngoại sinh, được thêm vào cách ly độc lập. Bằng cách tự thụ phấn, thế hệ con thích hợp có thể tạo ra các thực vật đồng hợp tử đối với cả hai gen ngoại sinh được thêm vào. Việc lai ngược với thực vật bố mẹ và lai chéo xa với thực vật không chuyển gen cũng được dự tính, như việc nhân giống sinh dưỡng. Mô tả về các phương pháp nhân giống khác thường được sử dụng cho các tính trạng và cây trồng khác nhau có thể được tìm thấy trong một số tài liệu tham khảo, ví dụ Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

"Đoạn dò" là axit nucleic được phân lập mà một phân tử nhãn hoặc phân tử đánh dấu thông thường được gắn với nó, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, phối tử, tác nhân quang hóa, hoặc enzym. Đoạn dò như vậy hỗ trợ cho sợi axit nucleic đích, trong trường hợp của sáng chế, hỗ trợ cho sợi ADN hệ gen từ sự kiện ngô MON89034 từ cây ngô hoặc từ mẫu chứa ADN từ sự kiện này. Các đoạn dò được mô tả không chỉ bao gồm deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn bao gồm các polyamit và các vật liệu dò khác gắn kết đặc hiệu với trình tự ADN đích và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của trình tự ADN đích này.

"Các đoạn mồi" là các axit nucleic được phân lập được gắn với sợi ADN đích hỗ trợ bằng cách lai hóa axit nucleic để tạo thành một thể lai giữa đoạn mồi và sợi ADN đích, sau đó kéo dài sợi ADN đích này bằng một polymeraza, ví dụ, ADN polymeraza. Các cặp đoạn mồi theo sáng chế dùng để chỉ ứng dụng của chúng trong việc khuếch đại trình tự axit nucleic đích, ví dụ, bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc bằng các phương pháp khuếch đại axit nucleic thông thường khác.

Các đoạn dò và các đoạn mồi thường có chiều dài 11 nucleotit hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 18 nucleotit hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 24 nucleotit hoặc nhiều hơn, và tốt nhất là 30 nucleotit hoặc nhiều hơn. Các đoạn dò và các đoạn mồi như vậy lai đặc hiệu với trình tự đích trong các điều kiện lai hóa cực kỳ nghiêm ngặt. Tốt hơn là, các đoạn dò và các đoạn mồi theo sáng chế có trình tự hoàn toàn tương tự với trình tự đích, mặc dù đoạn dò là khác với trình tự đích và vẫn có khả năng lai với các trình tự đích có thể được tạo ra theo các phương pháp thông thường.

Các phương pháp điều chế và sử dụng các đoạn dò và các đoạn mồi đã được mô tả trong tài liệu: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (hereinafter, "Sambrook et al., 1989"); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (được cập nhật định kỳ) (dưới đây gọi là "Ausubel et al., 1992"); và Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press: San Diego, 1990. Các cặp đoạn mồi dùng trong PCR có thể được tạo ra từ một trình tự đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng các chương trình máy tính để dùng cho mục đích này chẳng hạn như đoạn mồi (Version 0,5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

Các đoạn mồi và đoạn dò dựa trên ADN bọc sườn và các trình tự cài xen nêu trong bản mô tả có thể được sử dụng để xác nhận (và, nếu cần thiết, hiệu chỉnh) các trình tự được bọc lộ theo các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách tách dòng lại và xác định trình tự các trình tự này.

Các đoạn dò và các đoạn mồi axit nucleic được mô tả ở đây lại với trình tự ADN đích trong các điều kiện nghiêm ngặt. Phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic thông thường bất kỳ có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt của ADN từ một sự kiện chuyển gen trong mẫu. Các phân tử axit nucleic hoặc mảnh của nó có khả năng lai đặc hiệu với các phân tử axit nucleic khác trong các trường hợp nhất định. Được sử dụng trong bản mô tả này, hai phân tử axit nucleic được cho là có khả năng lai đặc hiệu với một phân tử khác nếu hai phân tử này có khả năng tạo thành một cấu trúc axit nucleic sợi kép không tương đương. Phân tử axit nucleic được cho là phân tử "bổ trợ" của phân tử axit nucleic khác nếu chúng có tính bổ trợ hoàn toàn. Được sử dụng trong bản mô tả này, các phân tử được gọi là có "tính bổ trợ hoàn toàn" khi mỗi nucleotit của phân tử này bổ trợ cho một nucleotit của phân tử khác. Hai phân tử được cho là "bổ trợ ở mức tối thiểu" nếu chúng có thể lai với một phân tử khác với độ ổn định đủ để cho phép chúng vẫn gắn được với một phân tử khác ít nhất là trong các điều kiện "có tính nghiêm ngặt thấp" thông thường. Tương tự, các phân tử được cho là "bổ trợ" nếu chúng có thể lai với một phân tử khác với độ ổn định đủ để cho phép chúng vẫn gắn được với một phân tử khác trong các điều kiện "có tính nghiêm ngặt cao" thông thường. Các điều kiện nghiêm ngặt thông thường được mô tả trong tài liệu: Sambrook et al., 1989, và Haymes et al., In: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical*

Approach, IRL Press, Washington, DC (1985), Vì vậy, không nhất thiết phải có tính hỗ trợ hoàn toàn, miễn là tính hỗ trợ như vậy không ngăn cản hoàn toàn khả năng tạo thành cấu trúc sợi kép của phân tử này. Để một phân tử axit nucleic có thể được dùng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò, nó chỉ cần hỗ trợ thích đáng về trình tự để có khả năng tạo thành cấu trúc sợi kép bền trong dung môi và nồng độ muối cụ thể được sử dụng.

Được sử dụng trong bản mô tả này, trình tự gần như tương đồng là trình tự axit nucleic sẽ lai đặc hiệu với trình tự hỗ trợ của trình tự axit nucleic mà nó được so sánh với trong các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao. Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp thúc đẩy sự lai ADN, ví dụ, 6,0 x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở nhiệt độ khoảng 45°C, sau đó rửa bằng 2,0 x SSC ở nhiệt độ 50°C, là các điều kiện mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật đã biết hoặc có thể được tìm thấy trong Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6,3,1-6,3,6. Ví dụ, nồng độ muối trong bước rửa có thể được chọn từ điều kiện có tính nghiêm ngặt thấp khoảng 2,0 x SSC ở 50°C đến điều kiện có tính nghiêm ngặt cao khoảng 0,2 x SSC ở nhiệt độ 50°C. Ngoài ra, nhiệt độ trong bước rửa có thể tăng từ các điều kiện có tính nghiêm ngặt thấp ở nhiệt độ trong phòng, khoảng 22°C, đến các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao ở nhiệt độ khoảng 65°C. Cả nhiệt độ và muối có thể được thay đổi, hoặc nhiệt độ hoặc nồng độ muối có thể được giữ không đổi trong khi biến số còn lại được thay đổi. Theo một phương án ưu tiên, axit nucleic theo sáng chế sẽ lai đặc hiệu với một hoặc nhiều phân tử axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO: 1 và 2 hoặc trình tự hỗ trợ của nó hoặc các mảnh của chúng trong các điều kiện có tính nghiêm ngặt vừa phải, ví dụ ở khoảng 2,0 x SSC và khoảng 65°C. Theo một phương án được ưu tiên cụ thể, axit nucleic theo sáng chế sẽ lai đặc hiệu với một hoặc nhiều phân tử axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 hoặc trình tự hỗ trợ hoặc các mảnh của nó trong các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao. Theo một khía cạnh, phân tử axit nucleic đánh dấu được ưu tiên có trình tự axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 hoặc trình tự hỗ trợ của nó hoặc mảnh của chúng. Theo một khía cạnh khác, phân tử axit nucleic đánh dấu được ưu tiên có mức tương đồng về trình tự với trình tự axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 hoặc trình tự hỗ trợ của nó hoặc mảnh của nó nằm trong khoảng từ 80% đến 100% hoặc từ 90% đến 100%. Theo một khía cạnh khác nữa, phân tử axit nucleic đánh dấu được ưu tiên có mức tương đồng về trình tự với trình tự như nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 hoặc trình tự hỗ trợ của nó hoặc mảnh của nó là 95% hoặc 100%. SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 có thể được sử dụng làm chất đánh dấu ở thực vật các phương pháp

nhân giống để nhận biết thể hệ con của cây lai di truyền tương tự với phương pháp đã nêu để phân tích chất đánh dấu ADN lặp lại trình tự, trong "ADN markers: Protocols, applications, and overviews: (1997) 173-185, Cregan, et al., eds., Wiley-Liss NY. Sự lai hóa giữa đoạn dò với phân tử ADN đích có thể được phát hiện bằng một số phương pháp mà người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật đã biết, các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhãn huỳnh quang, nhãn phóng xạ, nhãn dựa trên kháng thể, và nhãn quang hóa.

Liên quan đến việc khuếch đại trình tự axit nucleic đích (ví dụ, bằng PCR) bằng cách sử dụng một cặp đoạn mồi khuếch đại cụ thể, "các điều kiện nghiêm ngặt" là các điều kiện cho phép cặp đoạn mồi chỉ lai với trình tự axit nucleic đích mà đoạn mồi có trình tự kiểu đại tương ứng (hoặc trình tự bổ trợ của nó) sẽ gắn kết với nó và tốt hơn là tạo ra một sản phẩm khuếch đại duy nhất, đơn vị siêu sao chép, trong phản ứng khuếch đại ADN nhờ nhiệt.

Thuật ngữ "đặc hiệu đối với (trình tự đích)" chỉ ra rằng đoạn dò hoặc đoạn mồi chỉ lai với trình tự đích trong mẫu chứa trình tự đích này trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt.

Được sử dụng trong bản mô tả này, "ADN đã được khuếch đại" hoặc "đơn vị siêu sao chép" dùng để chỉ sản phẩm khuếch đại axit nucleic của trình tự axit nucleic đích là một phần của axit nucleic khuôn. Ví dụ, để xác định liệu cây ngô tạo ra từ phương pháp lai chéo hữu tính chứa ADN hệ gen sự kiện chuyển gen từ cây ngô theo sáng chế hay không, ADN được chiết từ mẫu mô cây ngô có thể được thực hiện phương pháp khuếch đại axit nucleic bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi bao gồm đoạn mồi có nguồn gốc từ trình tự bọc sườn trong hệ gen của cây này liền kề với vị trí cài xen của ADN được cài xen khác loài, và đoạn mồi thứ hai có nguồn gốc từ ADN được cài xen khác loài để tạo ra đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của dạng ADN này. Đơn vị siêu sao chép là một đoạn trình tự cũng là dấu hiệu chẩn đoán đối với dạng này. Đơn vị siêu sao chép có thể có chiều dài thay đổi từ chiều dài kết hợp của cặp đoạn mồi cộng với một cặp bazơ nucleotit, tốt hơn là cộng với khoảng năm mươi cặp bazơ nucleotit, tốt hơn nữa là cộng khoảng hai trăm năm mươi cặp bazơ nucleotit, và tốt hơn nữa là cộng khoảng bốn trăm năm mươi cặp bazơ nucleotit. Theo một cách khác, cặp đoạn mồi có thể có nguồn gốc từ trình tự bọc sườn ở cả hai phía của ADN được cài xen để tạo ra đơn vị siêu sao chép bao gồm trình tự nucleotit cài xen nguyên vẹn. Một thành phần của cặp đoạn mồi có nguồn gốc từ trình

tự hệ gen cây có thể được đặt cách xa phân tử ADN được cài xen một khoảng, khoảng cách này có thể thay đổi từ một cặp bazơ nucleotit đến khoảng hai mươi ngàn cặp bazơ nucleotit. Thuật ngữ “đơn vị siêu sao chép” đặc biệt loại trừ các đime đoạn mỗi có thể được tạo thành trong phản ứng khuếch đại ADN nhờ nhiệt.

Việc khuếch đại axit nucleic có thể được thực hiện bằng các phương pháp khuếch đại axit nucleic bất kỳ đã biết, bao gồm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Các loại phương pháp khuếch đại là đã biết và được mô tả trong Patent Mỹ các số 4,683,195 và 4,683,202 và trong quy trình PCR: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press, San Diego, 1990. Phương pháp khuếch đại nhờ phản ứng PCR đã được phát triển để khuếch đại tới 22kb của ADN hệ gen và tới 42kb của ADN thể thực khuẩn (Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994). Các phương pháp khuếch đại ADN này cũng như các phương pháp khác đã biết có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Trình tự của đoạn cài xen ADN khác loài hoặc trình tự bọc sườn từ sự kiện ngô MON89034 với mẫu hạt được nộp lưu với số ATCC có thể được thay đổi (và hiệu chỉnh nếu cần) bằng cách khuếch đại các trình tự từ dạng này bằng cách sử dụng các đoạn mồi có nguồn gốc từ các trình tự nêu trong bản mô tả, sau đó xác định trình tự ADN tiêu chuẩn của đơn vị siêu sao chép PCR hoặc của ADN đã được tách dòng.

Đơn vị siêu sao chép được tạo ra bằng các phương pháp này có thể được phát hiện bằng rất nhiều kỹ thuật. Một trong số các phương pháp này là Genetic Bit Analysis (Nikiforov, et al., Nucleic Acid Res. 22:4167-4175, 1994) trong đó oligonucleotit ADN được thiết kế chồng lên cả trình tự ADN hệ gen bọc sườn liền kề và trình tự ADN được cài xen. Oligonucleotit này được cố định trong các lỗ của đĩa vi lỗ. Sau khi thực hiện phản ứng PCR đối với vùng quan tâm (bằng cách sử dụng một đoạn mồi trong trình tự được cài xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bọc sườn liền kề), sản phẩm PCR dạng sợi đơn có thể được lai với oligonucleotit đã cố định và đóng vai trò làm khuôn cho phản ứng kéo dài bazơ đơn bằng cách sử dụng ADN polymeraza và ddNTP đã đánh dấu đặc hiệu đối với bazơ mong đợi tiếp theo. Việc đọc có thể dựa trên huỳnh quang hoặc ELISA. Một tín hiệu thể hiện sự có mặt của trình tự cài xen/ bọc sườn do khuếch đại, lai, và kéo dài đơn bazơ thành công.

Một phương pháp khác là kỹ thuật pyrosequencing như được mô tả bởi Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). Trong phương pháp này, một oligonucleotit được thiết kế sao cho chồng lên ADN hệ gen liền kề và mỗi nối ADN cài xen.

Oligonucleotit này được lai với sản phẩm PCR ở dạng sợi đơn từ vùng quan tâm (một đoạn môi trong trình tự được cài xen và một đoạn môi trong trình tự hệ gen bọc sườn) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeraza, ATP, sulfurylaza, luxiferaza, apyaza, adenosin 5' phosphosulfat và luxiferin. Các dNTP được bổ sung một cách riêng rẽ và sự kết hợp này tạo ra một tín hiệu yếu đo được. Một tín hiệu yếu cho thấy sự có mặt của đoạn cài xen gen chuyển/trình tự bọc sườn do sự khuếch đại, lai hóa, và kéo dài đơn hoặc đa bazơ thành công.

Phép phân cực huỳnh quang như được Chen và đồng tác giả mô tả (Genome Res. 9:492-498, 1999) là phương pháp có thể sử dụng để phát hiện đơn vị siêu sao chếp của sáng chế. Bằng cách sử dụng phương pháp này, một oligonucleotit được thiết kế chồng lên mối nối giữa trình tự bọc sườn hệ gen và ADN được cài xen. Oligonucleotit này được lai với sản phẩm PCR dạng sợi đơn từ vùng quan tâm (một đoạn môi trong ADN được cài xen này và một đoạn môi trong trình tự ADN hệ gen bọc sườn) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeraza và ddNTP đã được đánh dấu huỳnh quang. Sự kéo dài đơn bazơ dẫn đến sự hợp nhất của ddNTP. Sự hợp nhất này có thể được xác định bởi sự thay đổi về độ phân cực bằng cách sử dụng huỳnh quang kế. Sự thay đổi về độ phân cực cho thấy sự có mặt của đoạn cài xen gen chuyển /trình tự bọc sườn do sự khuếch đại, lai hóa, và kéo dài đơn bazơ thành công.

Taqman® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) được mô tả là phương pháp phát hiện và định lượng sự có mặt của trình tự ADN và đã được biết rõ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách ngắn gọn, đoạn dò oligonucleotit FRET được thiết kế chồng lên mối nối giữa trình tự bọc sườn hệ gen và ADN được cài xen. Đoạn dò FRET và các đoạn môi PCR (một đoạn môi trong trình tự ADN cài xen và một đoạn môi trong trình tự hệ gen bọc sườn) được đóng vòng với sự có mặt của polymeraza chịu nhiệt và dNTP. Sự lai hóa của đoạn dò FRET dẫn đến việc phân tách và giải phóng gốc huỳnh quang ra khỏi gốc dập tắt trên đoạn dò FRET. Tín hiệu huỳnh quang cho thấy sự có mặt của trình tự bọc sườn/ cài xen gen chuyển do sự khuếch đại và lai hóa thành công.

Phân tử Beacons được mô tả để sử dụng trong việc phát hiện trình tự như đã mô tả trong tài liệu (Nature Biotech.14:303-308, 1996). Một cách ngắn gọn, đoạn dò oligonucleotit FRET được thiết kế sao cho chồng lên mối nối ADN hệ gen bọc sườn và cài xen. Cấu trúc độc nhất của đoạn dò FRET khiến cho nó chứa cấu trúc thứ cấp giữ cho các gốc huỳnh quang và gốc dập tắt ở gần nhau. Đoạn dò FRET và các đoạn

mỗi PCR một đoạn mỗi trong trình tự ADN cài xen và một đoạn mỗi trong trình tự hệ gen bọc sườn) được đóng vòng với sự có mặt của polymeraza chịu nhiệt và dNTP. Sau khi thực hiện khuếch đại bằng PCR thành công, lai hóa giữa đoạn dò FRET với trình tự đích dẫn đến sự loại bỏ cấu trúc thứ cấp của đoạn dò và sự ngăn cách về mặt không gian của các gốc huỳnh quang và các gốc dập tắt, tạo ra tín hiệu huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang cho thấy sự có mặt của trình tự bọc sườn/cài xen gen chuyển do sự khuếch đại và lai hóa thành công.

Các phương pháp khác được mô tả, như nghiên cứu sự chảy của chất lỏng qua những khe rất hẹp (microfluidics) (Công bố đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 2006068398, Patent Mỹ số 6,544,734) đề xuất phương pháp và thiết bị tách và khuếch đại mẫu ADN. Thuốc nhuộm quang học được sử dụng để phát hiện và định lượng đặc hiệu các phân tử ADN (WO/05017181). Thiết bị ống cỡ nano (WO/06024023) chứa bộ cảm biến điện tử để phát hiện phân tử ADN hoặc các hạt cỡ nano gắn kết đặc hiệu phân tử ADN và sau đó có thể được phát hiện.

Kit phát hiện ADN được tạo ra bằng cách sử dụng hỗn hợp được đề cập trong bản mô tả. Kit này là hữu hiệu để nhận dạng ADN của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu và có thể được ứng dụng ít nhất là cho các phương pháp nhân giống cây ngô chứa ADN sự kiện thích hợp. Kit này chứa các đoạn mỗi và/hoặc đoạn dò ADN tương đồng hoặc bổ trợ cho các đoạn được chọn từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-7, hoặc các đoạn mỗi hoặc đoạn dò ADN tương đồng hoặc bổ trợ cho ADN chứa trong các yếu tố di truyền gen chuyển của ADN như nêu trong danh mục trình tự. Các trình tự ADN này có thể được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại ADN hoặc sử dụng làm đoạn dò trong phương pháp lai ADN để phát hiện sự có mặt của dấu hiệu chẩn đoán polynucleotit chẩn đoán sự có mặt của ADN đích trong mẫu. Việc tạo ra đơn vị siêu sao chép định trước trong phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt dùng để chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN tương ứng với ADN hệ gen PTA-7455 trong mẫu. Nếu phương pháp lai hóa được lựa chọn, việc phát hiện sự lai hóa giữa đoạn dò này với mẫu sinh học là phương pháp chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN của sự kiện chuyển gen MON89034 trong mẫu. Thông thường, mẫu là ngô, hoặc sản phẩm từ ngô hoặc bán sản phẩm của quá trình sử dụng ngô.

Sáng chế đề xuất cây ngô chuyển gen được gọi là sự kiện ngô MON89034, thể hệ con của cây, và tế bào của cây, cũng như hạt được tạo ra từ cây. Hạt tiêu biểu để trồng cây, để tạo ra thế hệ con, để thu nhận tế bào, hoặc để tạo ra cây từ hạt đã nêu

chứa sự kiện ngô chuyển gen đã được nộp lưu ngày 28 tháng 3 năm 2006 tại American Type Culture Collection (ATCC) và có số truy cập là PTA-7455.

Cây và tế bào và sản phẩm được tạo ra từ các phương án này và các phương án tương tự chứa ADN là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ tế bào bất kỳ có nguồn gốc từ sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học bất kỳ. Điều này là do hai trình tự mới này được chứa trong tế bào của sự kiện ngô chuyển gen MON89034. ADN dùng để chẩn đoán này chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, và SEQ ID NO:5. Mỗi quan hệ giữa các trình tự này được mô tả cụ thể hơn trong bản mô tả này và trong phần chú thích của Hình 1 và liên quan đến Hình 1.

Cây ngô được trồng từ hạt đồng hợp tử đối với ADN dùng để chẩn đoán sự kiện ngô chuyển gen MON89034 cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Cây ngô được trồng từ hạt dị hợp tử đối với ADN dùng để chẩn đoán sự kiện ngô chuyển gen MON89034 cũng thuộc phạm vi của sáng chế miễn là những hạt này cũng chứa trình tự ADN dùng để chẩn đoán này. Tế bào, hạt và mô được tạo ra từ thực vật chứa ADN chẩn đoán này cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Cây ngô và tế bào cây ngô và các dạng tương tự chứa ADN dùng để chẩn đoán sự kiện ngô chuyển gen MON89034 có tính kháng sự quấy phá bởi côn trùng cánh vảy. Các tế bào và cây này chứa ADN mã hoá protein diệt côn trùng (thuốc trừ sâu, chất gây độc) Cry2Ab và ADN có trình tự nucleotit SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 từ một phần của hệ gen của tế bào của cây. Cây và tế bào cây này còn chứa ADN mã hoá protein diệt côn trùng (thuốc trừ sâu, chất gây độc) Cry1A.105. Các protein này có thể được đề cập đến như là protein diệt côn trùng thứ nhất và thứ hai, tương ứng hoặc theo thứ tự ngược lại. Việc biểu hiện của các protein này đạt được từ các hợp phần gen điều hoà/các yếu tố di truyền được gắn vào cấu trúc biểu hiện tạo ra để biểu hiện mỗi trình tự ADN mã hoá các độc tố này và được mô tả đầy đủ trong bản mô tả này và trong phần chú giải của Hình 1 và liên quan đến Hình 1 và trình tự nêu trong SEQ ID NO:5. Cây ngô và tế bào cây ngô chứa các trình tự này là hữu hiệu để bảo vệ thực vật khỏi sự phá hoại bởi côn trùng gây hại thuộc bộ cánh vảy, cho dù là dị hợp tử hay đồng hợp tử đối với các alen trong đó trình tự mã hóa này có mặt.

Sáng chế cũng đề xuất các đơn vị siêu sao chép có thể được tạo ra từ các trình tự được nêu trong bản mô tả là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ ADN của sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học. Đơn

vị siêu sao chép dùng làm dấu hiệu chẩn đoán sự có mặt của ADN sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học bao gồm ít nhất một đoạn polynucleotit chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2. Các đơn vị siêu sao chép này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các trình tự đoạn mồi như được nêu trong phần mô tả dưới đây từ mẫu sinh học bất kỳ chứa ADN có nguồn gốc từ sự kiện ngô chuyển gen MON89034 với lượng ít nhất khoảng 0,5 femto-mol hoặc khoảng 0,5 pico-gam. Các nguồn ADN trong mẫu sinh học tương ứng với sự kiện ngô chuyển gen MON89034 có thể là bột ngô thô, dầu ngô, bánh ngô, ngô hạt, phôi ngô, tinh bột ngô, và bột ngô mịn và các dạng tương tự có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen này.

Phần mô tả cũng đề xuất phân tử polynucleotit được phân lập có các trình tự nucleotit liên kề như các trình tự nêu trong SEQ ID NO:5. Các trình tự nucleotit liên kề này bao gồm: (1) từ 11 đến 12000 nucleotit có chiều dài bất kỳ, và còn chứa các nucleotit liên kề như các nucleotit ở vị trí 1-11 hoặc 9-20 trong SEQ ID NO:1 và 1-11 hoặc 9-20 trong SEQ ID NO:2; (2) trình tự nucleotit liên kề bất kỳ như nêu trong SEQ ID NO:3 chứa từ 11 đến 2000 nucleotit có chiều dài bất kỳ, và còn chứa các nucleotit liên kề như các nucleotit ở vị trí 1-11 và 9-20 trong SEQ ID NO:1; trình tự nucleotit liên kề như nêu trong SEQ ID NO:4 chứa từ 11 đến 914 nucleotit có chiều dài bất kỳ, và còn chứa các nucleotit liên kề như các nucleotit vị trí 1-11 và 9-20 trong SEQ ID NO:2. Các phân tử polynucleotit được phân lập này có thể sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra một hoặc nhiều đơn vị siêu sao chép từ mẫu sinh học chứa ADN ngô. Việc phát hiện một đơn vị siêu sao chép như vậy là phương pháp chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu. Phân tử polynucleotit được phân lập cũng có thể được sử dụng trong nhiều phương pháp phát hiện nucleotit để phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học. Cụ thể, đoạn dò polynucleotit bao gồm ít nhất khoảng 11 nucleotit liên kề như nêu trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2 có thể dùng làm đoạn dò trong các phương pháp này để phát hiện ADN sự kiện chuyển gen MON89034 trong mẫu. Các trình tự bổ trợ của các phân tử polynucleotit được phân lập này cũng có thể được sử dụng trong các phương pháp phát hiện và/hoặc khuếch đại tương tự.

Kit dùng để phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học cũng được đề xuất. Kit này sử dụng phân tử polynucleotit dò, phân tử dò này chứa ít nhất từ 11 đến 12000 nucleotit liên kề có tính

trung đồng lớn, hoặc có tính hỗ trợ lớn đối với đoạn nucleotit bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO:5, có thể sử dụng để phát hiện sự có mặt của ADN MON89034 trong mẫu. Phân tử dò này cần chứa ít nhất một trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2. Trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 cũng có thể được gọi là trình tự nối, nghĩa là, trình tự ở đầu của ADN chuyển gen được cài xen vào cây ngô để thu được sự kiện ngô chuyển gen MON89034. Các trình tự này, tùy thuộc tương ứng được gọi là các đầu 5' và 3', chứa một phần trình tự ADN được cài xen và một phần trình tự bọc sườn hệ gen ngô. Ví dụ, SEQ ID NO:1 biểu thị đầu tận cùng 3' của trình tự hệ gen ngô bọc sườn đầu 5' của ADN được cài xen ở nửa 5' của nó, đầu 5' của ADN được cài xen này được biểu thị bởi nửa đầu 3' của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:2 biểu thị đầu tận cùng 3' của ADN được cài xen ở nửa 5' của nó, và đầu 5' của trình tự hệ gen ngô bọc sườn đầu 3' của ADN được cài xen ở nửa đầu 3' của nó. Trong hệ gen ngô xuất hiện trong tự nhiên ở vị trí của trình tự được cài xen như nêu trong SEQ ID NO:5, trình tự bọc sườn ở đầu 5' của ADN được cài xen và trình tự bọc sườn ở đầu 3' của ADN được cài xen được nối với nhau, và phân tử đoạn mỗi thứ nhất lai với trình tự hỗ trợ cho trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 (khác với 21 nucleotit ở đầu 3' của SEQ ID NO:3) và phân tử đoạn mỗi thứ hai lai với trình tự nêu trong SEQ ID NO:4 (khác với 20 nucleotit đầu 5' của SEQ ID NO:4) sẽ tạo ra đơn vị siêu sao chép trong phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt với khuôn là ADN khác với ADN MON89034 là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự vắng mặt của ADN được cài xen trong MON89034, và các đoạn mỗi tương tự sẽ tạo một đơn vị siêu sao chép chứa nhiều hơn 12000 nucleotit một chút (tùy thuộc vào vị trí của các đoạn mỗi trong trình tự bọc sườn như nêu trong SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4) khi sử dụng ADN MON89034 làm khuôn. Các phương án khác cũng được đề xuất.

Kit để phát hiện trình tự nối SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2 của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học được đề xuất. Kit này chứa đoạn dò polynucleotit hỗ trợ hoặc hỗ trợ hoàn toàn cho trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2 hoặc trình tự hỗ trợ của nó, và còn chứa một cặp đoạn mỗi để dùng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic. Cặp đoạn mỗi có thể được đề cập đến là đoạn mỗi thứ nhất bao gồm ít nhất từ 15 đến 50 các nucleotit liền kề từ một phần hệ gen ngô có SEQ ID NO:3 và đoạn mỗi thứ hai bao gồm ít nhất từ 15 đến 50 các nucleotit liền kề hỗ trợ cho phần ADN cài xen khác loài có SEQ ID NO:5. Đoạn mỗi thứ nhất của cặp đoạn mỗi polynucleotit lai đặc hiệu với trình tự hỗ trợ ngược tương ứng với trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 từ nucleotit vị trí 1 đến nucleotit vị trí 2050 và đoạn

mỗi thứ hai của cặp đoạn mỗi polynucleotit lai đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 từ khoảng nucleotit vị trí 2060 đến khoảng nucleotit vị trí 12,208, và được kéo dài về phía nhau để tạo thành đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO:1, đơn vị siêu sao chép này là dấu hiệu chẩn đoán sự có mặt của ADN của sự kiện MON89034 trong mẫu. Một cặp đoạn mỗi khác có thể được đề cập đến là đoạn mỗi thứ nhất bao gồm ít nhất từ 15 đến 50 các nucleotit liên kế hỗ trợ cho một phần hệ gen ngô có SEQ ID NO:4 và đoạn mỗi thứ hai bao gồm ít nhất từ 15 đến 50 các nucleotit liên kế từ phần ADN cài xen khác loài có SEQ ID NO:5. Đoạn mỗi thứ hai của cặp đoạn mỗi polynucleotit lai đặc hiệu với trình tự hỗ trợ ngược tương ứng với trình tự như nêu trong SEQ ID NO:5 từ nucleotit khoảng vị trí 1 đến nucleotit ở khoảng vị trí 11305 và đoạn mỗi thứ nhất của cặp đoạn mỗi polynucleotit lai đặc hiệu với trình tự như nêu trong SEQ ID NO:4 từ nucleotit ở khoảng vị trí 21 đến nucleotit ở khoảng vị trí 914, và được kéo dài về phía nhau để tạo thành đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO:2, đơn vị siêu sao chép này là dấu hiệu chẩn đoán sự có mặt của ADN của sự kiện MON89034 trong mẫu.

Các cặp đoạn mỗi này có thể sử dụng để tạo ra các đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2, tùy thuộc hoàn cảnh, và vì vậy chúng là dấu hiệu chẩn đoán sự có mặt của ADN của MON89034 trong mẫu sinh học. Các đơn vị siêu sao chép này cho phép phát hiện sự có mặt của trình tự nổi dùng để chẩn đoán sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học.

Phương pháp để tạo ra và phát hiện đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán đối với ADN của sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học chứa ADN ngô cũng được đề xuất. Phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với hai hoặc nhiều hơn hai đoạn mỗi trong phản ứng khuếch đại axit nucleic, thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, sau đó phát hiện đơn vị siêu sao chép. Sự có mặt của đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán đối với ADN của sự kiện này trong mẫu miễn là đơn vị siêu sao chép chứa ít nhất một trong số các trình tự liên kế nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2, từ nucleotit ở vị trí khoảng 1-11 hoặc 9-20, hoặc các trình tự hỗ trợ tương ứng với các vị trí này.

Các trình tự nucleotit là dấu hiệu chẩn đoán sự có mặt của sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong mẫu sinh học cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các phương pháp khác. Ví dụ, cho mẫu sinh học nghi ngờ chứa ADN MON89034 tiếp xúc với đoạn dò lai với một hoặc nhiều trình tự trong số các trình tự nucleotit nêu

trong SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2 trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt, đặt mẫu và đoạn dò trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt; và tiếp theo phát hiện sự lai hóa giữa đoạn dò này với trình tự nucleotit. Việc phát hiện sự lai hóa là phương pháp chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN MON89034 trong mẫu.

Đoạn mỗi polynucleotit dùng để tạo ra đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học theo phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt cũng được đề xuất theo sáng chế. Thông thường, các đoạn mỗi được đề xuất ở dạng cặp, thuận tiện nếu các thành phần của cặp đoạn mỗi này được đề cập đến như đoạn mỗi thứ nhất và đoạn mỗi thứ hai. Đoạn mỗi thứ nhất có thể chứa ít nhất khoảng 15 các nucleotit liền kề từ phần hệ gen ngô như nêu trong SEQ ID NO:3 và đoạn mỗi thứ hai có thể chứa ít nhất khoảng 15 các nucleotit liền kề bổ trợ cho phần ADN cài xen khác loài như nêu trong SEQ ID NO:5. Hai đoạn mỗi này sẽ tạo ra đơn vị siêu sao chép trong phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt với ADN khuôn thu được từ ADN sự kiện ngô MON89034 chứa trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO:1. Theo một cách khác, đoạn mỗi thứ nhất có thể chứa ít nhất khoảng 15 nucleotit liền kề từ một phần hệ gen ngô có SEQ ID NO:4, và đoạn mỗi thứ hai có thể chứa ít nhất khoảng 15 nucleotit liền kề bổ trợ cho phần ADN cài xen khác loài có SEQ ID NO:5. Hai đoạn mỗi này sẽ tạo ra đơn vị siêu sao chép trong phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt với ADN khuôn nhận được từ ADN của sự kiện ngô MON89034 chứa trình tự polynucleotit nêu trong SEQ ID NO:2.

Một phương pháp khác để phát hiện trình tự nội của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học chứa ADN ngô, như SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2, bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với đoạn dò polynucleotit lai với một trong số các trình tự nội trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt, đặt mẫu và đoạn dò trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt; và phát hiện sự lai hóa giữa đoạn dò này với trình tự nội. Việc phát hiện sự gắn kết/lai hóa giữa đoạn dò với trình tự nội biểu thị sự có mặt của ADN MON89034 trong mẫu sinh học. Cây ngô được biến nạp ổn định, ADN của nó tạo ra đơn vị siêu sao chép ADN chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2 khi được thực hiện phương pháp nêu trong bản mô tả đều thuộc phạm vi sáng chế. Ví dụ về trình tự đoạn mỗi, cụ thể là một cặp trình tự đoạn mỗi, là như nêu trong phần ví dụ và trong SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7.

Một phương pháp khác để phát hiện sự có mặt của ADN sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học có thể bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với đoạn dò

lai với ADN MON89034 trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt và không lai với ADN hệ gen cây ngô không phải là ADN MON89034 trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt, đặt mẫu và đoạn dò này trong các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt, và tiếp theo phát hiện sự lai hóa giữa đoạn dò này với ADN MON89034. Đoạn dò phù hợp với phương án này là hoặc bổ trợ cho trình tự được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2. Việc phát hiện sự lai hóa giữa đoạn dò này với mẫu là phương pháp chẩn đoán đối với sự có mặt của polynucleotit của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu. Mẫu sinh học có thể là mẫu bất kỳ chứa ADN MON89034 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dầu ngô, bột ngô thô, bột ngô mịn, gluten ngô, bánh ngô, tinh bột ngô, dịch chiết lõi ngô, mô ngô, tế bào ngô, hạt ngô, phần ngô, mô rế ngô, DDGS, và thậm chí là etanol được sản xuất dưới dạng bán sản phẩm của quá trình lên men ngô chuyển gen miễn là mẫu này chứa ít nhất một lượng polynucleotit có thể phát hiện được để chẩn đoán sự có mặt của sự kiện MON89034 trong mẫu. Đoạn dò polynucleotit có thể là nucleotit bất kỳ được chọn từ nhóm gồm axit deoxyribonucleic, axit ribonucleic, và chất tương tự nucleotit, và có thể được đánh dấu bằng ít nhất một chất phát huỳnh quang, phân tử chứa một chất đồng vị phát xạ, hoặc phân tử kiểu hapten có thể được phát hiện đặc hiệu bằng kháng thể hoặc phản ứng kiểu gắn kết khác.

Giống ngô chứa ADN để chẩn đoán sự có mặt của ADN của sự kiện chuyển gen MON89034 có thể thu được bằng cách nhân giống cây ngô chứa ADN của sự kiện ngô chuyển gen MON89034 với cây ngô khác ngoài sự kiện MON89034 để tạo ra cây ngô lai chứa ADN dùng để chẩn đoán sự kiện này. Cây ngô lai này chứa ADN dùng để chẩn đoán sự kiện ngô chuyển gen MON89034 thuộc phạm vi của sáng chế, cũng như hạt được sản xuất từ cây lai (miễn là chứa ADN dùng để chẩn đoán sự kiện ngô chuyển gen MON89034), và phần hoa, noãn, hạt, rế, hoặc lá của cây ngô lai MON89034, miễn là chúng chứa trình tự ADN dùng để chẩn đoán, và thế hệ con được sản xuất từ các phương án này.

Sáng chế đề xuất phương pháp bảo vệ cây ngô khỏi sự phá hoại bởi côn trùng cánh vảy bao gồm bước đưa vào thức ăn của côn trùng cánh vảy gây hại đích một hoặc nhiều tế bào cây ngô chuyển gen, mỗi tế bào cây ngô chứa trong hệ gen của nó một polynucleotit tương ứng với trình tự như nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 và trình tự nucleotit liền kề như nêu trong SEQ ID NO:5 giữa SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2. Côn trùng cánh vảy đích ăn tế bào cây ngô chuyển gen này bị ức chế khỏi sự ăn tiếp cây ngô mà tế bào cây ngô có nguồn gốc từ đó.

Sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm độc đối với côn trùng gây hại đích thuộc bộ cánh vảy của cây ngô. Chế phẩm chứa tế bào thực vật chuyển gen được đưa vào thức ăn của côn trùng cánh vảy gây hại đích, trong đó mỗi tế bào của cây ngô chuyển gen chứa một polynucleotit tương ứng với trình tự như nêu trong cả SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2, cùng với trình tự nucleotit liền kề như nêu trong SEQ ID NO:5 nằm giữa SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2 trong hệ gen của nó, là hữu hiệu để bảo vệ chống lại sự phá hoại bởi côn trùng cánh vảy ở cây ngô hoặc tế bào cây ngô, miễn là cây ngô hoặc tế bào này biểu hiện Cry1A.105 và/hoặc Cry2Ab2 từ cấu trúc biểu hiện được chứa trong trình tự nucleotit liền kề. Chế phẩm như vậy, ở dạng hạt ngô chuyển gen, đã được nộp lưu tại American Type Culture Collection với Số hiệu truy nhập PTA-7455. Cây ngô kháng côn trùng như vậy, hoặc các bộ phận của nó, sẽ chứa ADN trong hệ gen của tế bào của thực vật có ít nhất một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, và SEQ ID NO:5. Thế hệ con và hạt của cây ngô kháng côn trùng, trong đó thế hệ con và hạt có trình tự chẩn đoán được đề cập đến trong bản mô tả này, cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Cây ngô kháng côn trùng như vậy có thể được tạo ra theo phương pháp bao gồm bước cho cây ngô chuyển gen sự kiện MON89034 lai chéo với một cây ngô khác, và chọn lọc thế hệ con kháng côn trùng bằng cách phân tích ít nhất một trình tự nucleotit được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:5.

Sự kiện ngô chuyển gen kháng côn trùng MON89034 có thể được kết hợp với các giống ngô chuyển gen khác, như ngô kháng thuốc trừ cỏ như glyphosat, glufosinat, và diaacamba, và các thuốc trừ cỏ tương tự, hoặc ngô kháng côn trùng phá hoại rễ do sự cài xen của các trình tự mã hoá protein như PS149B1 và Cry3Bb được cải biến, hoặc các giống ngô chuyển gen khác kháng sự phá hoại bởi côn trùng cánh vảy do sự cài xen của trình tự mã hoá khác ngoài protein gây độc như VIP3A, Cry1Ab, và Cry1Fa và các protein tương tự. Các dạng kết hợp khác của tất cả các sự kiện chuyển gen khác nhau này được nhân giống với cây ngô theo sáng chế, nghĩa là, sự kiện MON89034, để tạo ra các giống ngô chuyển gen lai kháng lại sự phá hoại bởi bộ cánh cứng và bộ cánh vảy, và kháng lại các loại thuốc trừ cỏ chọn lọc. Những giống này có năng suất và các đặc tính chịu hạn được cải thiện so với các giống không chuyển gen và các giống với các tính trạng đặc biệt.

Phương pháp tạo ra cây ngô kháng sự phá hoại bởi côn trùng được đề xuất, trong đó cây ngô chứa độc tố mã hóa trình tự như nêu trong SEQ ID NO:5 với lượng hữu hiệu có tác dụng diệt côn trùng. Phương pháp này bao gồm bước chiết độc tố mã hóa các trình tự từ sự kiện ngô chuyển gen MON89034 và đưa các trình tự mã hóa này, riêng rẽ hoặc cùng nhau, vào một hoặc nhiều tế bào ngô, để tạo ra tế bào ngô chuyển gen chứa một hoặc nhiều trình tự mã hóa độc tố này. Tiếp theo, tế bào ngô chuyển gen được trồng (được tái sinh) thành cây ngô chuyển gen chứa một hoặc nhiều trình tự mã hóa, và nhờ đó cây chuyển gen có tính kháng sự phá hoại bởi côn trùng.

Phương pháp xác định sự tiếp hợp giao tử của ADN của cây ngô chuyển gen chứa ADN sự kiện ngô MON89034, đối với ADN là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN MON89034 trong mẫu sinh học, được đề xuất bởi sáng chế. Phương pháp này bao gồm, ở bước thứ nhất, cho mẫu tiếp xúc với ba đoạn mồi khác nhau bao gồm SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:10, khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại axit nucleic chứa ADN sự kiện ngô MON89034, tạo ra đơn vị siêu sao chép thứ nhất là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự kiện ngô MON89034, và khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic chứa ADN hệ gen ngô khác ngoài ADN MON89034, tạo ra đơn vị siêu sao chép thứ hai là dấu hiệu chẩn đoán đối với ADN hệ gen ngô khác ngoài ADN MON89034. Các bước sau bao gồm thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, và so sánh các đơn vị siêu sao chép được tạo ra trong phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt. Việc phát hiện sự có mặt của các đơn vị siêu sao chép là phương pháp chẩn đoán sự tiếp hợp giao tử của mẫu. Việc chỉ phát hiện thấy đơn vị siêu sao chép thứ nhất cho thấy mẫu chỉ chứa ADN MON89034, nghĩa là, mẫu đồng hợp tử. Việc chỉ phát hiện thấy đơn vị siêu sao chép thứ hai cho thấy mẫu không chứa ADN MON89034. Việc phát hiện thấy đồng thời đơn vị siêu sao chép thứ nhất và thứ hai trong mẫu cho thấy mẫu chứa (1) ADN dị hợp tử đối với mẫu tinh khiết chỉ chứa vật liệu ban đầu dị hợp tử, hoặc (2) mẫu chứa đồng thời ADN mẫu ban đầu đồng hợp tử và dị hợp tử, hoặc (3) mẫu chứa một số hỗn hợp gồm đồng hợp tử, dị hợp tử, và/hoặc các mẫu khác ngoài ADN MON89034.

Sáng chế cũng đề xuất việc trồng cây ngô chứa ADN là dấu hiệu chẩn đoán đối với đoạn ADN chuyển gen được cài xen vào hệ gen của tế bào của cây ngô. ADN trong hệ gen của tế bào ngô này bao gồm một hoặc tất cả các trình tự được chọn từ nhóm gồm:

- (a) trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO:5;

(b) cả hai trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2;

(c) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:3; và

(d) trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO:4.

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm minh họa về các phương án được ưu tiên nhất định theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong phần ví dụ theo sau là các phương pháp mà các tác giả sáng chế cho là tốt để thực hiện sáng chế, và vì vậy có thể được coi là tạo thành các ví dụ về các phương thức ưu tiên để thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật sẽ, dựa trên bản mô tả của sáng chế, hiểu rằng có thể thực hiện những thay đổi bất kỳ trong các phương án cụ thể đã được bộc lộ và vẫn đạt được kết quả tương tự hoặc giống mà không đi chệch khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Ví dụ này minh họa việc xây dựng và mô tả đặc trưng phân tử của sự kiện ngô chuyển gen MON89034.

Cây ngô MON89034 được tạo ra bằng quy trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của dòng ngô lai cùng dòng với cấu trúc plasmit pMON38850 (cấu trúc biểu hiện được thể hiện trên Hình 1). Phương pháp biến nạp được sử dụng là tương tự với phương pháp được mô tả trong Patent Mỹ số 6,603,061. Cấu trúc plasmit pMON38850 chứa cấu trúc biểu hiện thực vật được liên kết với các yếu tố di truyền điều hoà cần để biểu hiện protein diệt côn trùng Cry1A.105 ở các tế bào cây ngô. Tế bào ngô được tái sinh thành cây ngô nguyên vẹn chứa ít nhất khoảng 23.000 sự kiện chuyển gen khác nhau. Các sự kiện (cây) chuyển gen riêng rẽ được chọn từ quần thể các sự kiện thể hiện tính toàn vẹn của cấu trúc biểu hiện ở thực vật và chống lại việc ấu trùng của côn trùng cánh vảy ăn và gây ra hư hại. Cây ngô chứa cấu trúc biểu hiện thực vật được liên kết pMON38850 trong hệ gen của nó là một khía cạnh của sáng chế. Sau khi phân tích các sự kiện chuyển gen này, sự kiện chuyển gen MON89034 được chọn dựa trên cơ sở đặc trưng phân tử của nó và sự vắng mặt của những ảnh hưởng khiếm khuyết về mặt nông học hoặc kiểu hình không mong muốn.

Các trình tự của các yếu tố di truyền gen chuyển được chứa trong hệ gen ngô MON89034 như được minh họa trên Hình 1 bao gồm các yếu tố sau, mỗi yếu tố liên

kết có thể điều khiển với một yếu tố khác. Trước tiên, đầu 5' được xác định một cách tùy tiện của trình tự này (nghĩa là, gần với phần giữa về phía trái của đoạn được mô tả trên Hình 1) được gắn nhãn một phần của vùng bờ phải (right border region - RB) từ *Agrobacterium tumefaciens*. Tiếp theo sau trong trình tự này là cấu trúc biểu hiện chứa yếu tố gen khởi đầu CaMV 35S được tăng cường (trong bản mô tả này được gọi là P-CaMV35Sen, nằm ở các vị trí từ 2350 đến 2651 trong SEQ ID NO:5); trình tự dẫn chưa dịch mã protein gắn kết chất diệt lục A/B ở lúa mỳ (trong bản mô tả này được gọi là L-Ta.lhcb1, nằm ở các vị trí từ 2678 đến 2738 trong SEQ ID NO:5); trình tự intron actin ở lúa (trong bản mô tả này được gọi là I-Os.Act1, nằm ở các vị trí từ 2755 đến 3234 trong SEQ ID NO:5); trình tự mã hoá gen khảm Cry1A.105 không xuất hiện trong tự nhiên (nằm ở các vị trí từ 3244 đến 6777 trong SEQ ID NO:5); và vùng tận cùng 3' từ lúa mỳ (trong bản mô tả này được gọi là T-Ta.Hsp17-1:1:1, nằm ở các vị trí từ 6809 đến 7018 trong SEQ ID NO:5). Hỗn hợp gồm các yếu tố nêu trên, ngoài trình tự bờ, cùng hoạt động khi ở trong cây ngô dẫn đến sự biểu hiện của protein diệt côn trùng Cry1A.105. Sau đó, các yếu tố này được liên kết theo trình tự với một cấu trúc biểu hiện khác chứa các yếu tố sau: gen khởi đầu thể khảm Figwort (nằm ở các vị trí từ 7086 đến 7649 trong SEQ ID NO:5), trình tự dẫn Hsp70 ở *Zea mays* (trong bản mô tả này được gọi là HSP70 hoặc I-Hsp70, nằm ở các vị trí từ 7672 đến 8475 trong SEQ ID NO:5), và trình tự mã hóa peptit chuyển lục lạp *Zea mays* (trong bản mô tả này được gọi là CTP2 hoặc TS-SSU-CTP, nằm ở các vị trí từ 8492 đến 8892 trong SEQ ID NO:5). Tiếp theo, các đoạn liên kết có điều khiển này được liên kết với trình tự nucleotit mã hoá protein diệt côn trùng Cry2Ab (nằm ở các vị trí từ 8893 đến 10800 trong SEQ ID NO:5), được liên kết ở đầu 3' của nó với vùng không dịch mã ở đầu 3' của gen tổng hợp nopalin ở *Agrobacterium tumefaciens* (trong bản mô tả này được gọi là T-AGRtu.nos-1:1:13, nằm ở các vị trí từ 10827 đến 11377 trong SEQ ID NO:5). Các yếu tố này bọc sườn trình tự mã hóa Cry2Ab hoạt động cùng nhau để biểu hiện Cry2Ab khi có mặt trong cây ngô. Sau đó, trình tự cấu trúc biểu hiện Cry2Ab được theo sau bởi một trình tự nucleotit chứa phần thích đáng của vùng bờ trái (left border - LB) từ *Agrobacterium tumefaciens*.

Các phân tử ADN có thể được dùng làm các đoạn môi trong phương pháp khuếch đại ADN có thể có nguồn gốc từ các trình tự của các yếu tố di truyền của gen chuyển cài xen được chứa trong sự kiện MON89034. Các phân tử đoạn môi này có thể được sử dụng làm một phần của cặp đoạn môi cũng bao gồm phân tử đoạn môi ADN có nguồn gốc từ hệ gen của dạng bọc sườn đoạn cài xen gen chuyển.

Phần ADN plasmit pMON38850 được cài xen vào hệ gen ngô, tạo ra cây ngô chuyển gen sự kiện MON89034, bao gồm các đoạn bờ trái và bờ phải và hai cấu trúc biểu hiện thực vật được liên kết (cấu trúc biểu hiện thứ nhất mã hoá Cry1A.105, và cấu trúc biểu hiện thứ hai mã hoá Cry2Ab, trong đó mỗi cấu trúc biểu hiện có thể hoán đổi cho nhau tùy theo kết cấu nào được thiết kế làm kết cấu thứ nhất hoặc kết cấu thứ hai) nằm giữa các đoạn bờ được mô tả đặc trưng theo các phương pháp phân tích phân tử cụ thể. Các phương pháp phân tích này được thực hiện để nhận biết các dạng chỉ chứa một đoạn được cài xen duy nhất và nguyên vẹn bao gồm các bờ và hai cấu trúc biểu hiện mong muốn nằm giữa các bờ này (số vị trí hợp nhất thuộc hệ gen ngô), số bản sao (số bản sao của thể biến nạp (T)-ADN trong một locus), và tính toàn vẹn của cấu trúc biểu hiện gen được cài xen (nghĩa là, sự vắng mặt của sự sắp xếp lại hoặc sự biến đổi trình tự bất kỳ từ trình tự đã biết là có mặt trong plasmit pMON38850). Đoạn dò phân tử ADN được sử dụng bao gồm vùng mã hóa Cry1A.105 nguyên vẹn và yếu tố điều hoà tương ứng của nó, gen khởi đầu, intron, và các trình tự adenyl hóa của cấu trúc biểu hiện thực vật, và vùng ADN bộ khung plasmit pMON38850. Số liệu nhận được từ các phương pháp phân tích tất cả các sự kiện đã chứng tỏ rằng MON89034 chứa một đoạn cài xen T-ADN duy nhất với một bản sao của cấu trúc biểu hiện Cry1A.105. Không có các yếu tố khác từ vật truyền biến nạp pMON38850, được liên kết hoặc không được liên kết với cấu trúc biểu hiện gen nguyên vẹn, được phát hiện trong hệ gen của MON89034. Cuối cùng, phương pháp PCR và phân tích trình tự ADN được thực hiện để xác định các mối nối giữa hệ gen thực vật với các đầu 5' và 3' của đoạn cài xen, xác nhận cấu tạo của các yếu tố trong đoạn cài xen này (xem ví dụ, Hình 1), và xác định trình tự đầy đủ của ADN này được cài xen vào hệ gen cây ngô để thu được ngô chuyển gen sự kiện MON89034. Trình tự được cài xen đầy đủ, cùng với một phần của trình tự bọc sườn hệ gen ngô ở đầu của ADN được cài xen, được mô tả trong trình tự nêu trong SEQ ID NO:5.

ADN hệ gen từ MON89034, và ADN không chuyển gen từ ngô khác không phải MON89034 (ADN đối chứng) được chiết từ hạt ngô bằng cách trước tiên xử lý hạt (tối 200 hạt) thành bột mịn trong máy lắc Harbil 5G-HD paint (Harbil Inc, Cincinnati, Ohio). Một cách ngắn gọn, hạt đã chế biến thành bột được chiết trong dung dịch đệm chiết (EM Science Cat. No. 3700, EM Science, Gibbstown, New Jersey, USA) và ADN được kết tủa từ dung dịch bằng isopropanol (Sigma Cat. No. I-0398, Sigma, St. Louis, MO, USA). ADN đã được kết tủa được cuộn lại vào trong ống vi ly tâm chứa 70 phần trăm ethanol. ADN này được kết viên trong thiết bị vi ly tâm ở vận

tốc tối đa (~14,000 vòng/phút) trong ~5 phút, làm khô trong chân không, và được hoà tan trong dung dịch đệm TE (pH 8,0). Tiếp theo, ADN được bảo quản ở 4°C trong tủ lạnh. Phương pháp này có thể được cải biến bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật để chiết ADN từ một hạt ngô.

Ví dụ về các phương pháp được dùng để nhận biết sự kiện MON89034 trong mẫu được mô tả trong phương pháp PCR TAQMAN^d điểm cuối đặc hiệu dạng mà ví dụ về các điều kiện của phương pháp này được mô tả trong bảng 1 và bảng 2. Các đoạn mồi ADN được dùng trong thử nghiệm là các đoạn mồi SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), đoạn mồi PB880 được gắn nhãn 6FAMTM (SEQ ID NO:14) và đoạn mồi PB2931 được gắn nhãn VICTM (SEQ ID NO:15), 6FAM và VIC là các sản phẩm nhuộm huỳnh quang của Applied Biosystems (Foster City, CA) được gắn vào các đoạn mồi ADN. Đối với đoạn dò TAQMAN^d MGB, hoạt tính 5'-exonucleaza của Taq ADN polymeraza tách đoạn dò này từ đầu 5', giữa chất phát huỳnh quang và chất dập tắt. Khi được lai với sợi ADN đích, chất dập tắt và chất phát huỳnh quang được tách riêng một cách thích đáng trong không gian ba chiều để tạo ra tín hiệu huỳnh quang (chiều dài bước sóng kích thích huỳnh quang).

SQ2842 (SEQ ID NO:6), và SQ2843 (SEQ ID NO:7), khi được dùng trong các phương pháp phản ứng này với PB880 (SEQ ID NO:14) tạo ra ADN đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán đối với ADN sự kiện MON89034. Các mẫu đối chứng cho phương pháp phân tích này bao gồm mẫu đối chứng dương tính từ ngô chứa ADN sự kiện MON89034, mẫu đối chứng âm tính từ ngô không chuyển gen hoặc từ ngô chuyển gen khác không phải sự kiện MON89034, và mẫu đối chứng âm tính không chứa ADN khuôn.

SQ1564 (SEQ ID NO:17) và SQ1565 (SEQ ID NO:18) khi được sử dụng trong những phương pháp phản ứng này với PB351 (SEQ ID NO:21) tạo ra đơn vị siêu sao chép là dấu hiệu chẩn đoán Cry1A.105 trong MON89034.

Các thử nghiệm này được tối ưu hóa để dùng với các thiết bị Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 hoặc Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, hoặc Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler. Các phương pháp và thiết bị khác tạo ra các đơn vị siêu sao chép nhận biết ADN sự kiện MON89034 đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật biết rõ.

Đoạn dò bất kỳ gắn kết đặc hiệu với SEQ ID NO:1 hoặc với trình tự bổ trợ ưu tiên của nó trong mẫu sinh học và chứa ít nhất 11 nucleotit liên kề như nêu trong SEQ ID NO:1, hoặc tùy theo hoàn cảnh, trình tự bổ trợ ngược của trình tự này trong SEQ ID NO:1, miễn là việc gắn kết có thể phát hiện được, là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu này. Đoạn dò bất kỳ gắn kết đặc hiệu với SEQ ID NO:2 hoặc với trình tự bổ trợ ưu tiên của nó trong mẫu sinh học và chứa ít nhất 11 nucleotit liên kề như nêu trong SEQ ID NO:2, hoặc tùy theo hoàn cảnh, trình tự bổ trợ ngược của trình tự này trong SEQ ID NO:2, miễn là việc gắn kết có thể phát hiện được, là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu.

Cặp đoạn dò bất kỳ được sử dụng cho hoặc được thiết kế để tạo ra đơn vị siêu sao chép từ mẫu sinh học chứa ADN ngô, và đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2, hoặc tùy theo hoàn cảnh, chứa cả hai trình tự này, được coi là thuộc phạm vi của sáng chế. Đơn vị siêu sao chép bất kỳ như vậy chứa SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:2 hoặc cả hai trình tự này được coi là, đối với mục đích của sáng chế được nêu trong bản mô tả, dấu hiệu chẩn đoán sự có mặt của ADN sự kiện ngô MON89034 trong mẫu sinh học. Các ví dụ sau đây chỉ là những ví dụ dẫn chứng.

Bảng 1. PCR TAQMAN^d điểm cuối đặc hiệu đối với sự kiện ngô MON89034

Bước	Chất phản ứng	Lượng	Chú thích
1	Nước không chứa nucleaza	Bổ sung đến thể tích cuối là 10 μ l	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	5 μ l	nồng độ cuối là 1X
3	Các đoạn mồi SQ2842 (SEQ ID NO:6), và SQ2843(SEQ ID NO:7) được tạo huyền phù lại trong nước không chứa nucleaza đến nồng độ 20 μ M mỗi loại)	0,5 μ l	nồng độ cuối là 1,0 μ M
4	đoạn mồi 6FAM TM PB880 (SEQ ID NO:14) (được tạo huyền phù lại trong nước không chứa nucleaza đến nồng độ 10 μ M)	0,2 μ l	nồng độ cuối là 0,2 μ M
5	đoạn mồi đối chứng bên trong SQ2842 và đoạn mồi đối chứng bên trong SQ2843	0,2 μ l	nồng độ cuối là 0,2 μ M
6	ADN được chiết (khuôn): ☐ Mẫu được phân tích (các lá riêng rẽ) ☐ Mẫu đối chứng âm tính ☐ Mẫu đối chứng âm tính	3,0 μ l ☐ 4-80ng ADN hệ gen ☐ 4ng ADN hệ gen ngô không chuyển gen ☐ Không có ADN khuôn (dung dịch trong đó ADN được tạo huyền phù lại)	Được pha loãng trong nước

	☐ Mẫu đối chứng dương tính ☐ Mẫu đối chứng dương tính	☐ 4ng ADN hệ gen từ ngô dị hợp tử sự kiện MON89034 đã biết ☐ 4ng ADN hệ gen từ ngô đồng hợp tử sự kiện MON89034 đã biết	
7	Trộn nhẹ, thêm 1-2 giọt dầu khoáng lên trên của mỗi ống phản ứng.		

Sự khuếch đại ADN có thể được bố trí và thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ để gia nhiệt theo chu trình, bao gồm thao tác bằng tay hoặc thao tác được điều khiển điện tử đối với các bước và chu trình nhiệt độ. Các thiết bị gia nhiệt theo chu trình Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, hoặc Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler hoặc Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 hoặc MJ Research DNA Engine PTC-225 đã được sử dụng thành công để kiểm soát các thông số chu trình sau đây. Khi chạy PCR trong Eppendorf Mastercycler Gradient hoặc MJ Engine, chu trình nhiệt được quay vòng theo cách đã tính toán. Khi sử dụng Perkin-Elmer 9700, các điều kiện quay vòng được thực hiện với tốc độ ramp đặt ở giá trị cực đại.

Bảng 2. Các điều kiện của chu trình nhiệt trong thử nghiệm tiếp hợp giao tử

Chu trình số	Cài đặt: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
1	50°C 2 phút
1	95°C 10 phút
10	95°C 15 giây 64°C 1 phút (-1°C/chu kỳ)
30	95°C 15 giây 54°C 1 phút
1	10°C vĩnh viễn

Ví dụ 2

Ví dụ này minh họa sự nhận dạng cây ngô chứa ADN dùng để chẩn đoán sự kiện ngô chuyển gen MON89034 trong hệ gen của nó và xác định sự tiếp hợp giao tử của cây ngô này.

Các phương pháp được sử dụng để nhận biết dị hợp tử từ thể hệ con đồng hợp tử chứa ADN sự kiện MON89034 trong hệ gen của nó được mô tả trong thử nghiệm tiếp hợp giao tử mà ví dụ về các điều kiện cho thử nghiệm này được nêu trong Bảng 3 và Bảng 4. Ví dụ về các đoạn mồi ADN được dùng trong thử nghiệm tiếp hợp giao tử là các đoạn mồi SQ2842 (SEQ ID NO: 6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), SQ6523 (SEQ ID NO:10), SQ6524 (SEQ ID NO:11), đoạn mồi PB880 được gắn nhãn 6FAM™ (SEQ ID NO:14) và đoạn mồi PB2931 được gắn nhãn VIC™ (SEQ ID NO:15). Như được chỉ ra ở trên, 6FAM và VIC là các sản phẩm nhuộm huỳnh quang của Applied Biosystems (Foster City, CA) được gắn với ADN đoạn mồi.

SQ2842 (SEQ ID NO:6), SQ2843 (SEQ ID NO:7), SQ6523 (SEQ ID NO:10), SQ6524 (SEQ ID NO:11), khi được sử dụng cùng nhau trong phản ứng khuếch đại nhờ nhiệt trong đó mẫu sinh học mang ADN khuôn chứa ADN là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu, tạo ra đơn vị siêu sao chép ADN là dấu hiệu chẩn đoán đối với ADN ngô khác ngoài ADN sự kiện ngô MON89034 (phụ thuộc vào ADN ngô này có nguồn gốc từ mẫu không chuyển gen hoặc từ một số mẫu chuyển gen khác). Theo một cách khác, phản ứng này sẽ tạo ra hai đơn vị siêu sao chép ADN khác nhau từ một mẫu sinh học chứa ADN có nguồn gốc từ hệ gen ngô dị hợp tử đối với alen tương ứng với ADN được cài xen có mặt trong sự kiện ngô chuyển gen MON89034. Hai đơn vị siêu sao chép khác nhau này sẽ tương ứng với đơn vị siêu sao chép thứ nhất có nguồn gốc từ locus hệ gen ngô kiểu hoang, và đơn vị siêu sao chép thứ hai là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của ADN sự kiện ngô MON89034. Mẫu ADN ngô chỉ tạo ra một đơn vị siêu sao chép tương ứng với đơn vị siêu sao chép thứ hai được mô tả đối với hệ gen dị hợp tử là dấu hiệu chẩn đoán đối với sự có mặt của sự kiện ngô MON89034 trong mẫu và là dấu hiệu chẩn đoán để xác định rằng ADN ngô được sử dụng làm khuôn bắt nguồn từ hạt ngô đồng hợp tử đối với alen tương ứng với ADN được cài xen trong sự kiện ngô chuyển gen MON89034. Các mẫu đối chứng dùng cho phương pháp phân tích này sẽ bao gồm mẫu đối chứng dương tính từ ngô đồng hợp tử và dị hợp tử chứa ADN sự kiện MON89034, mẫu đối chứng âm tính từ ngô không chuyển gen hoặc giống ngô chuyển gen bất kỳ khác, và mẫu đối chứng âm tính chứa ADN không khuôn. Thử

nghiệm này được tối ưu hóa để dùng với thiết bị gia nhiệt theo chu trình Stratagen Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, hoặc Eppendorf Mastercycler Gradient. Các phương pháp và thiết bị khác để tạo ra các đơn vị siêu sao chép nhận biết sự tiếp hợp giao tử giữa thể hệ con của cây lai chéo được tạo ra với cây MON89034 đã được người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật biết rõ.

Bảng 3. Các dung dịch phản ứng dùng trong thử nghiệm tiếp hợp giao tử

Bước	Chất phản ứng	Lượng	Chú thích
1	Nước không chứa nucleaza	Thêm đến thể tích cuối 5 μ l	-
2	2X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat. # 4304437)	2,5 μ l	nồng độ cuối là 1X
3	Các đoạn mồi SEQ ID NO:6, và SEQ ID NO:7 (được tạo huyền phù lại trong nước không chứa nucleaza đến nồng độ 20 μ M)	0,05 μ l	nồng độ cuối là 0,25 μ M
4	đoạn mồi PB880 SEQ ID NO:14 6FAM TM (được tạo huyền phù lại trong nước không chứa nucleaza đến nồng độ 10 μ M)	0,01 μ l	nồng độ cuối là 0,4 μ M
5	đoạn mồi PB2931 SEQ ID NO:15 VIC TM (được tạo huyền phù lại trong nước không chứa nucleaza đến nồng độ 10 μ M)	0,01 μ l	nồng độ cuối là 0,15 μ M
6	<i>REDTaq</i> ADN polymeraza (1 đơn vị / μ l)	1,0 μ l (nên đổi pipet trước bước tiếp theo)	1 đơn vị/phản ứng
7	ADN (khuôn) được chiết:	2,0 μ l	Được pha loãng

	☐ Các mẫu được phân tích (các lá riêng rẽ) ☐ Mẫu đối chứng âm tính ☐ Mẫu đối chứng âm tính ☐ Mẫu đối chứng dương tính ☐ Mẫu đối chứng dương tính	☐ 4-80ng ADN hệ gen ☐ 4ng ADN hệ gen ngô không chuyển gen ☐ Không có ADN khuôn (dung dịch trong đó ADN được tạo lại huyền phù) ☐ 4ng ADN hệ gen từ ngô dị hợp tử sự kiện MON89034 đã biết ☐ 4ng ADN hệ gen từ ngô đồng hợp tử sự kiện MON89034 đã biết	trong nước
8	Trộn nhẹ, thêm 1-2 giọt dầu khoáng lên trên mỗi ống phản ứng.		

Sự khuếch đại ADN trong thiết bị gia nhiệt theo chu trình Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, hoặc Eppendorf Mastercycler Gradient hoặc Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 hoặc MJ Research ADN Engine PTC-225 đã được sử dụng thành công để kiểm soát các thông số của chu trình sau đây. Khi sử dụng Eppendorf Mastercycler Gradient hoặc MJ Engine, các chu trình được kiểm soát theo phương thức đã tính toán. Khi sử dụng Perkin-Elmer 9700, các chu trình được thực hiện với tốc độ ramp đặt ở cực đại.

Bảng 4. Các điều kiện chu trình nhiệt trong thử nghiệm tiếp hợp giao tử ^a

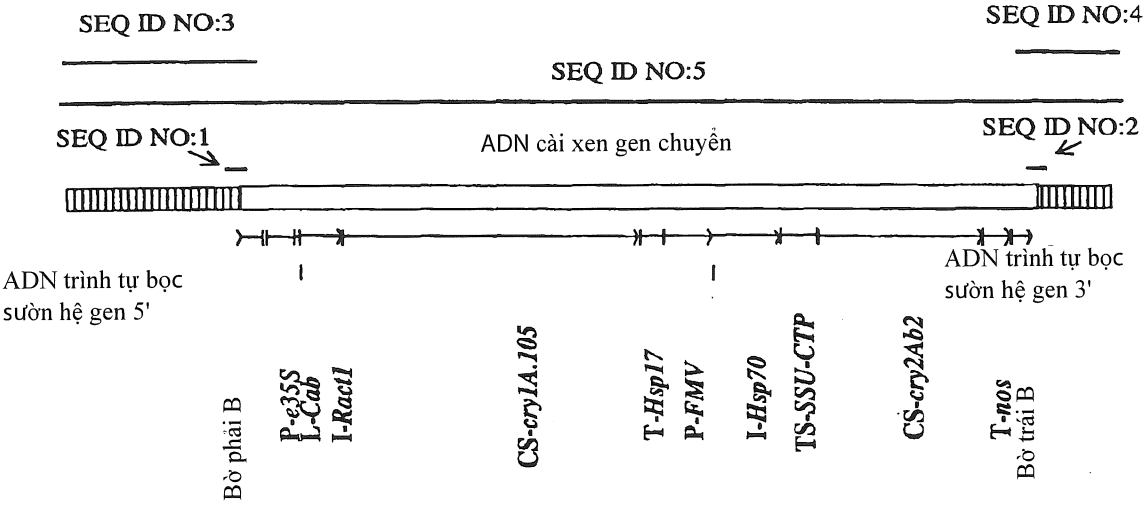
Số chu trình theo thứ tự kế tiếp	Nhiệt độ và khoảng thời gian
1	50°C 2 phút
1	95°C 10 phút
10	95°C 15 giây 64°C 1 phút (-1°C/chu trình)
30	95°C 15 giây 54°C 1 phút
1	10°C ngâm

a: bằng cách sử dụng Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700

Hạt tương ứng với sự kiện chuyển gen MON89034 đã được nộp lưu ngày 28 tháng 3 năm 2006 theo hiệp ước Budapest tại American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110. Số hiệu nộp lưu ATCC hoặc tên mẫu nộp lưu của sáng chế là PTA-7455. Mẫu nộp lưu này sẽ được giữ tại nơi nộp lưu trong khoảng thời gian là 30 năm, hoặc 5 năm sau lần yêu cầu cuối cùng, hoặc trong khoảng thời hạn hiệu lực của bằng, bất kể là khoảng thời gian này dài như thế nào, và sẽ được thay nếu cần trong khoảng thời gian này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong từ SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:5, và các trình tự bổ trợ hoàn toàn của chúng.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này là từ sự kiện ngô MON89034, mẫu tiêu biểu của hạt chứa sự kiện này đã được nộp lưu tại American Type Culture Collection (ATCC) với số truy cập là PTA-7455.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này có trong cây ngô, tế bào cây ngô, hạt ngô hoặc các bộ phận của cây ngô.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này là đơn vị siêu sao chép chẩn đoán sự có mặt của ADN từ sự kiện MON89034.
5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:2.
6. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:4.
7. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN này chứa trình tự được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong từ SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:4 và các trình tự bổ trợ hoàn toàn của chúng, và còn chứa trình tự nucleotit bao gồm trình tự mã hóa Cry1A.105 và trình tự nucleotit bao gồm trình tự mã hóa Cry2AB.



Hình 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MONSANTO TECHNOLOGY LLC
 Anderson, HEATHER
 Douglas, Jennifer
 GROAT, JEANNA
 JOHNSON, SCOTT
 KELLY, REBECCA
 KORTE, JOHN
 RICE, JAMES

<120> Phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit

<130> 11899.0260.00PC00

<150> PCT/US2007/069662
 <151> 2007-05-24

<150> 60/808,834
 <151> 2006-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nối 5'; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 2051-2071

<400> 1
 aatgagtatg atggatcagc a 21

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nối 3'; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 11295-11314

<400> 2
 actcattgca tccccggaaa 20

<210> 3
 <211> 2071
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự bọc sườn 5' cộng mỗi nối;
 tương ứng với SEQ ID NO:5 ở 1-2071

<400> 3
 aatattttaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60
 tttttgaagt ttcaaaaggg agctttcagg gtcgcttaga gtttggttgg ttggaaatac 120

aagcgaaaag agagctaattg agggggacat ccataattttc tatggtgttt gaataagagt 180
cacgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggt tccaaaaaat 240
cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg 300
cgcccgccgg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc 360
ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcggggtgg 420
cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg 480
ggtaggtagg taggtggaga tttttgttaa ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540
gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtggtt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600
gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggtctt cttagcgggtt aagggtgtgt 660
ttggtttggc ttttggtttt ggctttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720
at ttggtttt actttttggt tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaagg 780
gtagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag 840
caccctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagttag ctttttaacg gcttacagcc 960
tacaacagct ttttccacag ctacacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020
ccaaacagac cccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080
gtagtgtaaa actgaaaaca cccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaactgtg 1140
aaaacatata tcgaagaact ttaacgact tttagtgtt tccaccaaac gatttctagc 1200
tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttcacagc tcacagccca caacaacttt 1260
ttctacagcc acaacccaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg 1320
tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac 1380
catccaacaa ggccggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct 1440
ccaccgttcg ccgccgtcca ctacaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacag 1500
cacgtgggg agggaaaaaa aggcagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tattgtacgc 1560
gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct 1620
ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgctc cgtccgtccg ctggagcgga 1680
cacggaccgc ggcgctctgc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgctca 1740
cgcatgctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccttg ccgcctgccg 1800
gccggctttt ttattattat tggaacatga ggctatttct cctcccacac gggctacgac 1860
gtgagcacga gtactgggat ccccgatcc gccctctctg tccctgctgc tactccagcc 1920
actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaaacc catgcacggc 1980
cattcaaatt caggtgcccc cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040

aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc a

2071

<210> 4
 <211> 914
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự bọc sườn 3' cộng mỗi nối;
 tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 11295-12208

<400> 4
 actcattgca tccccggaaa ttatgttttt ttaaaaacca cggattattata gataccgtgt 60
 tatttttttga gtattggaaa tttcatttca acccaaagtt ttttcatggc acatctagct 120
 tttgcctaata accatgtagg gctacatctt aaaaatctat actactatat taaagctgca 180
 ggggtagcct gtctccacct ggttctgcct cgagccaatc taaaccgtcc atctatatcc 240
 atcaaatacag caccgtccgg tccgtgcgca cctcctctcc cgctattcag ttgcatactt 300
 gcagcagggt ctccctcctc accatttcct ctgcctcctc tctcgctcac tggtcagatt 360
 catcctgcct ctcccgcatg cgctccctcc ccatgccccg tctcgacta tcgccacacc 420
 tcaccgcggg gagacgaaga cggtaggacgc atcctcacct cctccgctag ttgtcgctct 480
 tccatcctct tcaacaactt ctacataggg agaggcggtt cggcgctccg acgccgccgc 540
 ttctccctc cccatggagg acgagaacat cgacctcggc ggcgggggcg atgcctccgc 600
 tctgcataga ggaggggtgt agtggaagc agcaatgcc aacccgaggc gggccaagac 660
 taggcaacaa taggacggca cggcgggttg tcagcgaggt ggcggcatcg tgtgccgcta 720
 ccgaacaaca tctccggcgc tggagtcggt gagttactgc gccaccgga cgccctcaat 780
 gcactgatat ctaccggtc tccatcgccg ccttctctcc ctccctctc cctgtgcctc 840
 cctctcttgc cctctccctt ccaactgctc ccgccccagc cctagcccaa ccacctccg 900
 cgcaggggtca ccaa 914

<210> 5
 <211> 12208
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự bọc sườn 5' cộng trình tự ADN cài xen cộng trình tự bọc sườn 3'

<400> 5
 aatattttaa aatggaagta atactatatt aaaatgattc atgtggaact cctgcgcttc 60
 tttttgaagt ttcaaaagg agctttcagg gtcgcttaga gtttgtttg ttggaaatac 120
 aagcgaaaag agagctaata agggggacat ccatattttc tatggtgttt gaataagagt 180
 caccgcgggaa taagatgaac accgaaacaa tttttttgta gctacgtggg tccaaaaaat 240

cgagtagacg gtgtcgcttc cacctcatac tacttcaacc tcaaaccaca catccttacg 300
 cgcccgcgcg tgtctccgtc gtctcaagtt ctcaacatac ctacacatgt aaccactacc 360
 ggtctttgtc atgtttcgaa agaagattac aggtcctcta gaagagagga cgcggggtgg 420
 cgagaaagct ggggaagaaa aaggctagta catatgattg gtctgtgaac ctgtgaggtg 480
 ggtaggtagg taggtggaga tttttgttaa ctggtgttgt tgacggactc gaacggggcc 540
 gggcgtgtgg tgtggctagc tgtggtgggt tgctcgccag ccagccagcc acacatcagc 600
 gagcatgcag agcttaagca tgtatgtacg gatcggcttg cttagcgggt aagggtgtgt 660
 ttggtttggc ttttggtttt ggcttttgcc ccctaaaagc caaaagccaa ccaagggtgt 720
 atttggtttg acttttggtt tttggctttt gtcccctaaa agccaaaagc caaacaagg 780
 gttagatcta ggaagcagct ttttctaaaa gctggctttc tcacagtgc aatctgaaag 840
 caccocctgaa cctgctttta gtggcttttc gaatggaact gtgaaaacat atatcgaaga 900
 acttttaacg acttttagtg gtttccacca aacagtttag ctttttaacg gcttacagcc 960
 tacaacagct ttttccacag ctacacagccc acagcaactt ttttcacagc cacagcccaa 1020
 ccaaacagac ccaaagggc tgaatccagg aagcagcttt ttctaaaagc cgactttctc 1080
 gtagtgtaaa actgaaaaca ccctggacc tgcttttagt ggcttttgga tggaactgtg 1140
 aaaacatata tcgaagaact tttaacgact tttagtgggt tccaccaaac gatttctagc 1200
 tttttaacag cacacagcct acaacagctt ttttcacagc tcacagccca caacaacttt 1260
 ttctacagcc acaaccaac caaacggacc ctaaggcggc cgagcgagcg caaagcgtcg 1320
 tcagctttga ttgccatgcc atctcctgct ccacttgtct ctctggccgt cgtcagccac 1380
 catccaacaa ggccggtgct actggcggct cctaggtaga cgacgacgac gacgacacct 1440
 ccacggttcg ccgccgtcca ctaccaatc aacacggaac gcccaaaaca cacacacag 1500
 cacgctgggg agggaaaaaa aggagagac atatgcgtgc gtcgctgcat tattgtacgc 1560
 gatcgaatgg catctctctc actctctctc ctccctttat taatctggta ctggctagct 1620
 ggtccggcga caccgacgtg tcagctccgt cgcgcgcgtc cgtccgtccg ctggagcgga 1680
 cacggaccgc ggctctgtc gatcgccggc tcgccgcagc gcagctacct agcacgtca 1740
 cgcagtctac actgcctaca cgcacacggc cggcccaaaa gcgttccttg ccgcctgccg 1800
 gccggctttt ttattattat tggaacatga ggctatttct cctcccacac gggctacgac 1860
 gtgagcacga gtactgggat ccccgatcc gccctctctg tcctgctgc tactccagcc 1920
 actgaaatgt tgtcagatga aacagcagag ccgatctccg cacggaaacc catgcacggc 1980
 cattcaaatt caggtgccca cgtacgtcag ggtgctgctg ctactactat caagccaata 2040
 aaaggatggt aatgagtatg atggatcagc aatgagtatg atggtcaata tggagaaaaa 2100
 gaaagagtaa ttaccaattt tttttcaatt caaaaatgta gatgtccgca gcgttattat 2160

aaaatgaaag	tacatthttga	taaaacgaca	aattacgatc	cgtcgtatth	ataggcgaaa	2220
gcaataaaca	aattattcta	attcggaaat	ctthatttcg	acgtgtctac	attcacgtcc	2280
aaatgggggc	ttagatgaga	aacttcacga	tttggcgcg	caaagcttgg	tcgagtggaa	2340
gctagctthc	cgatcctacc	tgtcacttca	tcaaaaggac	agtagaaaag	gaaggtggct	2400
cctacaaatg	ccatcattgc	gataaaggaa	aggccatcgt	tgaagatgcc	tctgccgaca	2460
gtgggtccca	agatggaccc	ccaccacga	ggagcatcgt	ggaaaaagaa	gacgttccaa	2520
ccacgtcttc	aaagcaagtg	gattgatgtg	atatctccac	tgacgtaagg	gatgacgcac	2580
aatcccacta	tccttcgcaa	gacccttcct	ctatataagg	aagttcattt	catttgagaa	2640
ggacacgctg	acaagctgac	tctagcagat	cctctagaac	catcttccac	acactcaagc	2700
cacactattg	gagaacacac	agggacaaca	caccataaga	tccaagggag	gcctccgccg	2760
ccgccggtaa	ccaccccgcc	cctctcctct	ttctttctcc	gttttttttt	ccgtctcggt	2820
ctcgatctth	ggccttggtg	gtttgggtgg	gcgagaggcg	gcttcgtgcg	cgcccagatc	2880
ggtgcgcggg	aggggcggga	tctcgcggt	ggggctctcg	ccggcgtgga	tccggcccgg	2940
atctcgcggg	gaatggggct	ctcggatgta	gatctgcgat	ccgccgttgt	tgggggagat	3000
gatggggggg	ttaaaatttc	cgccgtgcta	aacaagatca	ggaagagggg	aaaagggcac	3060
tatggtttat	attttttatat	atttctgctg	cttcgtcagg	cttagatgtg	ctagatctth	3120
ctthcttctt	tttgtgggta	gaatttgaat	ccctcagcat	tgthcatcgg	tagtttttct	3180
tttcatgatt	tgtgacaaat	gcagcctcgt	gcggagctth	tttgtaggta	gaagtgatca	3240
accatggaca	acaacccaaa	catcaacgag	tgcatcccg	acaactgcct	cagcaaccct	3300
gaggctcgagg	tgtctggcgg	tgagcgcac	gagaccggt	acaccccat	cgacatctcc	3360
ctctccctca	cgagttcct	gtcagcgag	ttcgtgccag	gcgtggctt	cgtcctgggc	3420
ctcgtggaca	tcatctgggg	catctttggc	ccctcccagt	gggacgcctt	cctggtgcaa	3480
atcgagcagc	tcatcaacca	gaggatcgag	gagttcgcca	ggaaccaggc	catcagccgc	3540
ctggaggggc	tcagcaacct	ctaccaaata	tacgtgaga	gcttccgcga	gtgggaggcc	3600
gaccccaacta	accagctct	ccgcgaggag	atgcgcatcc	agttcaacga	catgaacagc	3660
gccctgacca	ccgccatccc	actcttcgcc	gtccagaact	accaagtccc	gctcctgtcc	3720
gtgtacgtcc	aggccgccaa	cctgcacctc	agcgtgctga	gggacgtcag	cgtgtttggc	3780
cagaggtggg	gcttcgacgc	cgccaccatc	aacagccgct	acaacgacct	caccaggtg	3840
atcggcaact	acaccgacca	cgctgtccgc	tggtacaaca	ctggccgtcc	tggacattgt	3900
gtccctcttc	ccgaactacg	actcccgcac	ctacccgatc	cgacccgtgt	cccaactgac	3960
ccgcgaaatc	tacaccaacc	ccgtcctgga	gaacttcgac	ggtagcttca	ggggcagcgc	4020
ccagggcac	gagggctcca	tcaggagccc	acacctgatg	gacatcctca	acagcatcac	4080

tatctacacc gatgccacc gcggcgagta ctactggtcc ggccaccaga tcatggcctc	4140
cccggtcggc ttcagcggcc ccgagtttac ctttcctctc tacggcacga tgggcaacgc	4200
cgctccacaa caacgcacgc tcgctcagct gggccagggc gtctaccgca ccctgagctc	4260
caccctgtac cgcaggccct tcaacatcgg tatcaacaac cagcagctgt ccgtcctgga	4320
tggcactgag ttgcctacg gcacctcctc caacctgcc tccgctgtct accgcaagag	4380
cggcacggtg gattccctgg acgagatccc accacagaac aacaatgtgc cccccaggca	4440
gggtttttcc cacaggctca gccacgtgtc catgttcgcg tccggcttca gcaactcgtc	4500
cgtgagcatc atcagagctc ctatgttctc ttggatacac cgtagtgctg agttcaacaa	4560
catcattgca tccgacagca ttactcaaat acccttggtg aaagcacata cacttcagtc	4620
aggtactact gttgtcagag gtccagggtt tacaggagga gacattcttc gtcgcacaag	4680
tggaggaccc tttgcttaca ctattgttaa catcaatggc caattgcccc aaaggatatc	4740
tgcaagaatc cgctatgcct ctactacaaa tctcaggatc tacgtgactg ttgcagggtga	4800
aaggatcttt gctggtcagt tcaacaagac tatggatacc ggtgaccctt tgacattcca	4860
atcttttagc tacgcaacta tcaacacagc ttttacattc ccaatgagcc agagtagctt	4920
cacagtaggt gctgacactt tcagctcagg gaatgaagtt tacatcgaca ggtttgaatt	4980
gattccagtt actgcaaccc tcgaggctga gtacaacctt gagagagccc agaaggctgt	5040
gaacgccctc tttacctcca ccaatcagct tggcttgaaa actaacgtta ctgactatca	5100
cattgaccaa gtgtccaact tggtcaccta ccttagcgat gagttctgcc tcgacgagaa	5160
gcgtgaactc tccgagaaaag ttaaacacgc caagcgtctc agcgacgaga ggaatctctt	5220
gcaagactcc aacttcaaag acatcaacag gcagccagaa cgtggttggg gtggaagcac	5280
cgggatcacc atccaaggag gcgacgatgt gttcaaggag aactacgtca ccctctccgg	5340
aactttcgac gagtgctacc ctacctactt gtaccagaag atcgatgagt ccaaactcaa	5400
agccttcacc aggtatcaac ttagaggcta catcgaagac agccaagacc ttgaaatcta	5460
ctcgatcagg tacaatgcc a gcacgagac cgtgaatgtc ccaggtagct gttccctctg	5520
gccactttct gcccaatctc ccattgggaa gtgtggagag cctaacagat gcgctccaca	5580
ccttgagtgg aatcctgact tggactgtc ctgcagggat ggcgagaagt gtgcccacca	5640
ttctcatcac ttctccttgg acatcgatgt gggatgtact gacctgaatg aggacctcgg	5700
agtctgggtc atcttcaaga tcaagacca agacggacac gcaagacttg gcaaccttga	5760
gtttctcgaa gagaaacat tggtcggtga agctctcgct cgtgtgaaga gagcagagaa	5820
gaagtggagg gacaaacgtg agaaactcga atgggaaact aacatcgttt acaaggaggc	5880
caaagagtcc gtggatgctt tgttcgtgaa ctcccaatat gatcagttgc aagccgacac	5940
caacatcgcc atgatccacg ccgcagacaa acgtgtgcac agcattcgtg aggcttactt	6000

g c c t g a g t t g t c c g t g a t c c c t g g t g t g a a c g c t g c c a t c t t c g a g g a a c t t g a g g g a c g 6060
t a t c t t t a c c g c a t t c t c c t t g t a c g a t g c c a g a a c g t c a t c a a g a a c g t g a c t t c a a 6120
c a a t g g c c t c a g c t g c t g g a a t g t g a a a g g t c a t g t g g a c g t g g a g g a a c a g a a c a a t c a 6180
g c g t t c c g t c c t g g t t g t g c c t g a g t g g g a a g c t g a a g t g t c c c a a g a g g t t a g a g t c t g 6240
t c c a g g t a g a g g c t a c a t t c t c c g t g t g a c c g c t t a c a a g g a g g g a t a c g t g a g g g t t g 6300
c g t g a c c a t c c a c g a g a t c g a g a a c a a c a c g a c g a g c t t a a g t t c t c c a a c t g c g t c g a 6360
g g a a g a a a t c t a t c c c a a c a a c a c c g t t a c t t g c a a c g a c t a c a c t g t g a a t c a g g a a g a 6420
g t a c g g a g g t g c c t a c a c t a g c c g t a a c a g a g g t t a c a a c g a a g c t c c t c c g t t c c t g c 6480
t g a c t a t g c c t c c g t g t a c g a g g a g a a a t c c t a c a c a g a t g g c a g a c g t g a g a a c c c t t g 6540
c g a g t t c a a c a g a g g t t a c a g g a c t a c a c a c c a c t t c c a g t t g g c t a t g t t a c c a a g g a 6600
g c t t g a g t a c t t t c c t g a g a c g a c a a a g t g t g g a t c g a g a t c g g t g a a a c c g a g g g a a c 6660
c t t c a t c g t g g a c a g c g t g g a g c t t c t c t t g a t g g a g g a a t a a t g a g a t c t a t c g a t t c t 6720
a g a a g g c c t g a a t t c t g c a t g c g t t t g g a c g t a t g c t c a t t c a g g t t g g a g c c a a t t t g g 6780
t t g a t g t g t g t g c g a g t t c t t g c g a g t c t g a t g a c a t c t c t g t a t t g t g t t t c t t t c c 6840
c c a g t g t t t t c t g t a c t t g t g t a a t c g g c t a a t c g c c a a c a g a t t c g g c g a t g a a t a a a t 6900
g a g a a a t a a a t t g t t c t g a t t t t g a g t g c a a a a a a a a g g a a t t a g a t c t g t g t g t t t 6960
t t t g g a t c c c c g g g g c g g c c g c g t t a a c a a g c t t g a g c t c a g g a t t t a g c a g c a t t c c a g 7020
a t t g g g t t c a a t c a a c a a g g t a c g a g c c a t a t c a c t t t a t t c a a a t t g g t a t c g c c a a a a 7080
c c a a g a a g g a a c t c c c a t c c t c a a a g g t t t g t a a g g a a g a a t t c t c a g t c a a a g c c t c a 7140
a c a a g g t c a g g g t a c a g a g t c t c c a a a c c a t t a g c c a a a a g c t a c a g g a g a t c a a t g a a g 7200
a a t c t t c a a t c a a a g t a a a c t a c t g t t c c a g c a t g c a t c a t g g t c a g t a a g t t t c a g a 7260
a a a a g a c a t c c a c c g a a g a c t t a a a g t t a g t g g g c a t c t t t g a a a g t a a t c t t g t c a a c a 7320
t c g a g c a g c t g g c t t g t g g g g a c c a g a c a a a a a g g a a t g g t g c a g a a t t g t a g g c g c a 7380
c c t a c c a a a a g c a t c t t t g c c t t t a t t g c a a a g a t a a a g c a g a t t c c t c t a g t a c a a g t g 7440
g g g a a c a a a a t a a c g t g g a a a g a g c t g t c c t g a c a g c c c a c t c a c t a a t g c g t a t g a c g 7500
a a c g c a g t g a c g a c c a c a a a g a a t t c c c t c t a t a t a a g a g g c a t t c a t t c c a t t t g a 7560
a g g a t c a t c a g a t a c t c a a c c a a t c c t t c t a g g a t c t a c c g t c t t c g g t a c g c g t c a c t 7620
c c g c c c t c t g c c t t t g t t a c t g c c a c g t t t c t c t g a a t g c t c t c t t g t g t g g t g a t t g c t 7680
g a g a g t g g t t a g c t g g a t c t a g a a t t a c a c t c t g a a a t c g t g t t c t g c c t g t g c t g a t t 7740
a c t t g c c g t c c t t t g t a g c a g c a a a t a t a g g g a c a t g g t a g t a c g a a a c g a a g a t a g a a 7800
c c t a c a c a g c a a t a c g a g a a a t g t g t a a t t t g g t g c t t a g c g g t a t t t a t t t a a g c a c a t 7860
g t t g g t g t t a t a g g g c a c t t g g a t t c a g a a g t t t g c t g t t a a t t t a g g c a c a g g c t t c a t 7920

actacatggg tcaatagtat agggattcat attataggcg atactataat aatttgttcg	7980
tctgcagagc ttattatttg ccaaaattag atattcctat tctgtttttg tttgtgtgct	8040
gttaaattgt taacgcctga aggaataaat ataaatgacg aaattttgat gtttatctct	8100
gctcctttat tgtgaccata agtcaagatc agatgcactt gttttaaata ttgttgtctg	8160
aagaaataag tactgacagt attttgatgc attgatctgc ttgtttgttg taacaaaatt	8220
taaaaataaa gagtttcctt tttgttgctc tccttacctc ctgatggat ctagtatcta	8280
ccaactgaca ctatatgtgt tctctttaca tacgtatctt gctcgatgcc ttctccctag	8340
tgttgaccag tgttactcac atagtctttg ctcatctcat tgtaatgcag ataccaagcg	8400
gcctctagag gatcagcatg gcgcccaccg tgatgatggc ctcgctcgcc accgccgtcg	8460
ctccgttcca ggggctcaag tccaccgcca gcctccccgt cggccgcccgc tcctccagaa	8520
gcctcggcaa cgtcagcaac ggcggaagga tccggtgcat gcaggtaaca aatgcatcct	8580
agctagtagt tctttgcatt gcagcagctg cagctagcga gttagtaata ggaagggaac	8640
tgatgatcca tgcattgact gatgtgtgtt gcccatccca tcccatttcc caaccccaaa	8700
cgaacaaaaa cacacgtact acgtgcaggt gtggccggcc tacggcaaca agaagtctga	8760
gacgctgtcg tacctgccgc cgctgtcgac cggcgggcgc atccgctgca tgcaggccat	8820
ggacaactcc gtcctgaact ctggtcgac caccatctgc gacgcctaca acgtcgcggc	8880
gcatgatcca ttcagcttcc agcacaagag cctcgacact gttcagaagg agtggacgga	8940
gtggaagaag aacaaccaca gcctgtacct ggaccccatc gtcggcacgg tggccagctt	9000
ccttctcaag aaggctcggt ctctcgtcgg gaagcgcac ctctcggaac tccgcaacct	9060
gatctttcca tctggtcca ccaacctcat gcaagacac ctccaggaga ccgagaagtt	9120
tctcaaccag cgcctcaaca ctgataacct tgctcgcgtc aacgctgagc tgacgggtct	9180
gcaagcaaac gtggaggagt tcaaccgcca agtggacaac ttcctcaacc ccaaccgcaa	9240
tgcggtgcct ctgtccatca cttcttccgt gaacaccatg caacaactgt tcctcaaccg	9300
cttgccctcag ttccagatgc aaggctacca gctgctcctg ctgccactct ttgctcaggc	9360
tgccaacctg cacctctcct tcattcgtga cgtgatcctc aacgctgacg agtggggcat	9420
ctctgcagcc acgctgagga cctaccgcca ctacctgaag aactacacca gggactactc	9480
caactattgc atcaaacct accagtcggc cttcaagggc ctcaatacga ggcttcacga	9540
catgctggag ttcaggacct acatgttctt gaacgtgttc gagtacgtca gcatctggtc	9600
gctcttcaag taccagagcc tgctggtgtc cagcggcgcc aacctctacg ccagcggctc	9660
tggtcccaa caaactcaga gcttcaccag ccaggactgg ccattcctgt attcgttgtt	9720
ccaagtcaac tccaactacg tcctcaacgg cttctctggt gctcgcctct ccaacacctt	9780
ccccaacatt gttggcctcc ccggctccac cacaactcat gctctgcttg ctgccagagt	9840

gaactactcc ggcggcacatct cgagcggcga cattggtgca tcgccgttca accagaactt 9900
 caactgctcc accttcctgc cgccgctgct caccocgttc gtgaggctcct ggctcgacag 9960
 cggctccgac cgcgagggcg tggccaccgt caccaactgg caaaccgagt ctttcgagac 10020
 cacccttggc ctccggagcg ggccttcac ggcgcggtgga aattctaact acttccccga 10080
 ctacttcac aggaacatct ctggtgttcc tctcgtcgtc cgcaacgagg acctccgccg 10140
 tccactgcac tacaacgaga tcaggaacat cgctctccg tccgggacgc ccggagggtgc 10200
 aagggcgtag atggtgagcg tccataacag gaagaacaac atccacgctg tgcatgagaa 10260
 cggctccatg atccacctgg cgcccaatga ttacaccggc ttcaccatct ctccaatcca 10320
 cgccacccaa gtgaacaacc agacacgcac cttcatctcc gagaagttcg gcaaccaggg 10380
 cgactccctg aggttcgagc agaacaacac caccgccagg tacaccctgc gcggcaacgg 10440
 caacagctac aacctgtacc tgcgcgtcag ctccattggc aactccacca tcagggtcac 10500
 catcaacggg aggggtgtaca cagccaccaa tgtgaacacg acgaccaaca atgatggcgt 10560
 caacgacaac ggcgcccgt ttagcgacat caacattggc aacgtggtgg ccagcagcaa 10620
 ctccgacgtc ccgctggaca tcaacgtgac cctgaactct ggacccagt tcgacctcat 10680
 gaacatcatg ctggtgcaa ctaacatctc gccgctgtac tgataggagc tctgatcccc 10740
 atgggaattc ccgatcgctc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 10800
 gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 10860
 aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 10920
 tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcg 10980
 gcggtgtcat ctatgttact agatcgggga tatccccggg gcggccgcgg ggaattcgg 11040
 accaagcttt ggcgcgccaa atcgtgaagt ttctcatcta agccccatt tggacgtgaa 11100
 tgtagacacg tcgaaataaa gatttccgaa ttagaataat ttgtttattg ctttcgccta 11160
 taaatacgac ggatcgtaat ttgtcgtttt atcaaaatgt actttcattt tataataacg 11220
 ctgcggtacat ctacattttt gaattgaaaa aaaattggta attactcttt ctttttctcc 11280
 atattgacca tcatactcat tgcacccccg gaaattatgt ttttttaaaa accacgttat 11340
 tatagatacc gtgttatttt ttgagtattg gaaatttcat ttcaacccaa agtttcttca 11400
 tggcacatct agcttttgcc taataccatg tagggctaca tcttaaaaat ctatactact 11460
 atattaaagc tgcaggggta gcctgtctcc acctggttct gcctcgagcc aatctaaacc 11520
 gtccatctat atccatcaaa tcagcaccgt ccggtccgtg cgcacctcct ctcccgtat 11580
 tcagttgcat acttgacga ggttctccct cctcaccatt tcctctgcct cctctctcgc 11640
 tcaactgtca gattcatcct gcctctcccg catgcgctcc ctccccatgc cccgtctcgc 11700
 actatcgcca cacctcaccg cggggagacg aagacggtgg acgcatcctc acctcctccg 11760

ctagttgtcg ctcttccatc ctcttcaaca acttctacat agggagagggc ggttcggcgt 11820
 cccgacgcgcg ccgcttctcc cctcccatg gaggacgaga acatcgacct cggcggcggg 11880
 ggcgatgcct ccgctctgca tagaggaggg ttgtagtggc aagcagcaat gccaacaccg 11940
 aggcggggcca agactaggca acaataggac ggcacgcccg gttgtcagcg aggtggcggc 12000
 atcgtgtgcc gctaccgaac aacatctccg gcgctggagt cggtgagtta ctgcgccacc 12060
 cggacgcct caatgcactg atatctaccc ggtctccatc gccgcccttc ctcccttccc 12120
 tctccctgtg cctccctctc ttgccctctc ctttccaaact gctcccgccc cagccctagc 12180
 ccaaccacct cccgcgcagg gtcaccaa 12208

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 2034-2055

<400> 6

gcccaataaaa ggatggtaat ga 22

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

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 11345-11367

<400> 7

ctttttctcc atattgacca tca 23

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 8

ggtatccctc cagaccagca 20

<210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

<400> 9

gtggactcct tctggatggt gtaa

24

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 10

gtcaggggtgc tgctgctgct a

21

<210> 11

<211> 23

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 11

ggtttaagaa ccattttgct ccc

23

<210> 12

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở 2003-2026

<400> 12

tacgtcaggg tgctgctgct acta

24

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 13

atratttycg gggatgcaac caac

24

<210> 14

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 2061-2076

<400> 14

atggatcagc aatgag

16

<210> 15

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 15

ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt

26

<210> 16

<211> 26

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 16

ctgtcaagcc aataaaaggg ttgttt

26

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp

<400> 17

caactcgtcc gtgagcatca

20

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tổng hợp; trình tự bổ trợ ngược của trình tự tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 4605-4628

<400> 18

aactcagcac tacggtgtat ccaa

24

<210> 19

<211> 16

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự tổng hợp

 <400> 19

 gcctgccgca gaccaa 16

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

 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp

 <400> 20

 caatgcagag ctcagcttca tc 22

 <210> 21
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp; tương ứng với SEQ ID NO:5 ở vị trí 4587-4603

 <400> 21

 cagagctcct atgttct 17

 <210> 22
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự tổng hợp

 <400> 22

 tccagtagct gcagtcctc ctcctc 26