



(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)



1-0029479

(51)⁷ A01H 5/00; C12N 15/63; C12N 15/82; (13) B
C12N 15/29

- (21) 1-2014-02907 (22) 01/02/2013
(86) PCT/US2013/024410 01/02/2013 (87) WO2013/116700 08/08/2013
(30) 61/593,555 01/02/2012 US; 61/625,222 17/04/2012 US
(45) 25/09/2021 402 (43) 25/03/2015 324A
(73) DOW AGROSCIENCES LLC (US)
9330 Zionsville Rd., Indianapolis, Indiana 46268, United States of America
(72) LIRA, Justin M. (US); CICCHILLO, Robert M. (US); YERKES, Carla (US);
ROBINSON, Andrew E. (US).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

- (54) POLYNUCLEOTIT, VECTƠ, TẾ BÀO VẬT CHỦ, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA
THỰC VẬT KHÁNG GLYPHOSAT VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ CỎ DẠI
(57) Sáng chế đề cập đến một số polypeptit có nguồn gốc từ các enzym DGT của sinh vật
chưa có nhân điển hình, và các axit nucleic hữu ích trong việc mã hóa polypeptit này.

SEQ ID NO:67 DGT-33 (60) --DHHVGERFD-SFAADAD-----ITCDGATTAFLPTIAAAAGSTTAFDASAGHRRPFLPITRAITAD-VLEIR
SEQ ID NO:68 DGT-32 (57) --DHHVGERFA-SFAATAD-----ITCDGATTAFLPTIAAAAGSTTAFDASAGHRRPFLPITRAITAD-VLEIR
SEQ ID NO:145 DGT-31 (60) --DHHVGERFS-SFAADAD-----ITCDGATTAFLPTIAAAAGSTTAFDASAGHRRPFLPITRAITAD-VLEIR
SEQ ID NO:69 DGT-28 (60) --DHHVGERFD-SFAADAD-----ITCDGATTAFLPTIAAG-HSTTAFDASAGHRRPFLPITRAITAD-VLEIR
SEQ ID NO:70 ggr-23 (59) --DHHVGERFD-SFAADAD-----ITCDGATTAFLPTIAAG-HSTTAFDASAGHRRPFLPITRAITAD-VLEIR
SEQ ID NO:71 CP4 Agro (75) --DHHVGERFD-SFAADAD-----ITCDGATTAFLPTIAAG-HSTTAFDASAGHRRPFLPITRAITAD-VLEIR
SEQ ID NO:72 DGT-3 (74) VNRHAYVGGCGGIFASLLSPSDIELYGNASTAMRP1TAAWAGGNSVYLDGVFNSRERPGGLVLELGGAGNOC
SEQ ID NO:73 DGT-1 (81) TTKCATVGGCGGIFASLLSPSDIELYGNASTAMRP1TAAWAGGNSVYLDGVFNSRERPGGLVLELGGAGNOC
SEQ ID NO:74 DGT-7 (82) VAKRAMVSGGRTFVEKDAQEEVKLFYGNASTAMRP1TAAWAGGNSVYLDGVFNSRERPGGLVLELGGAGNOC
SEQ ID NO:75 araA (69) --DHTCE:IINGSTLNAD--ALELFGNASTAMRP1AAACLESN--DIVLTGERNSRERPGGLVLELGGAGNOC

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các polypeptit mới tham gia vào quá trình chuyển hóa N-(phosphonometyl) glyxin, và các axit nucleic mã hóa các polypeptit này. Sáng chế còn đề cập đến các thực vật, phần thực vật, và tế bào thực vật chứa các polypeptit và/hoặc axit nucleic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Từ lâu, cỏ dại đã là vấn đề cần giải quyết trong lĩnh vực trồng trọt. Lao động phòng trừ cỏ dại nặng nhọc có thể được giảm nhẹ hơn nhờ các thuốc hóa học diệt cỏ dại hiệu quả. Việc sử dụng phổ biến các thuốc diệt cỏ, cùng với các loại cây trồng và phân bón cải tiến, đã góp phần đáng kể vào “cuộc cách mạng xanh” trong nông nghiệp. Các thuốc diệt cỏ đặc biệt hữu ích là các thuốc có phổ hoạt tính diệt cỏ rộng. Không may, các thuốc diệt cỏ phổ rộng thường cũng gây tác dụng bất lợi trên cây trồng tiếp xúc với thuốc diệt cỏ. Một cách để khắc phục vấn đề này là tạo ra các cây mùa vụ chịu được thuốc diệt cỏ phổ rộng.

Một ví dụ về thuốc diệt cỏ phổ rộng là N-phosphonometyl-glyxin, còn được gọi là glyphosat. Glyphosat đã được nông dân trên toàn thế giới sử dụng rộng rãi để phòng trừ cỏ dại trước khi gieo trồng, ví dụ, trong canh tác không cày. Ngoài ra, glyphosat là phương án hiệu quả để phòng trừ cỏ dại và các cây mọc tự nhiên giữa các chu kỳ sản xuất hoặc quá trình luân canh. Glyphosat không chuyển sang đất sau khi sử dụng, và nó được coi phổ biến là một trong các thuốc diệt cỏ hóa học có hiệu quả rộng và an toàn với môi trường nhất có thể sử dụng trong nông nghiệp.

Glyphosat làm chết thực vật bằng cách ức chế con đường của axit shikimic. Con đường này dẫn đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thơm, bao gồm các axit amin, vitamin, và hormon thực vật. Glyphosat phong bế sự ngưng tụ của axit phosphoenolpyruvic (PEP) và axit 3-phosphoshikimic thành axit 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimic bằng cách gắn vào và ức chế hoạt động của enzym 5-

enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza, thường được gọi là “EPSP syntaza,” và “EPSPS.”

Không may là không có cây trồng nào chịu được glyphosat một cách tự nhiên, và, do đó, ích lợi của thuốc diệt cỏ này trong việc phòng trừ cỏ dại cho cây trồng còn bị hạn chế. Một phương pháp để tạo ra các cây trồng chịu được glyphosat là đưa gen mã hóa dạng chịu được glyphosat khác loại của gen EPSPS vào cây trồng bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền. Bằng cách gây đột biến hóa học, dạng chịu được glyphosat của EPSPS đã được tạo ra ở vi khuẩn, và các gen khác loại này được đưa vào thực vật để tạo ra thực vật chịu được glyphosat. Xem, ví dụ, Comai et al. (1983) Science 221:370-71. Các gen EPSPS khác loại có thể được biểu hiện quá mức ở các cây trồng để thu được mức độ chống chịu mong muốn.

Các ví dụ nêu trên về giải pháp kỹ thuật đã biết và hạn chế liên quan đến chúng được dự định để minh họa và không đầy đủ. Những hạn chế khác của giải pháp kỹ thuật đã biết sẽ trở nên hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này khi đọc phần mô tả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các polypeptit phân lập có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1, và các axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 (ví dụ, SEQ ID NO:2-4). Sáng chế còn đề xuất các thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và tế bào thực vật chứa polypeptit khác loại có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và/hoặc tế bào thực vật chứa axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1. Theo các ví dụ cụ thể, axit nucleic khác loại chứa trình tự nucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% so với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và/hoặc tế bào thực vật chứa axit nucleic khác loại lai với một axit nucleic khác có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao. Theo các ví dụ cụ thể, thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và/hoặc tế bào thực vật chứa axit nucleic khác loại lai với một axit nucleic khác có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện có độ

nghiêm ngặt cao bao gồm polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic khác loại truyền tính chống chịu glyphosat (hoặc làm tăng tính chống chịu glyphosat) cho thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và/hoặc tế bào thực vật này.

Theo phương án khác, sáng chế mô tả phương pháp tạo ra thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và/hoặc tế bào thực vật có tính kháng glyphosat bao gồm: biến nạp thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, và/hoặc tế bào thực vật này bằng axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1; và biểu hiện axit nucleic để tạo ra polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1.

Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các vector chứa axit nucleic mã hoá polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1. Theo các ví dụ cụ thể, sáng chế đề xuất các vector chứa axit nucleic mã hoá polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 95% so với SEQ ID NO:1. Ví dụ, vector có thể chứa trình tự axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3.

Các phương án cụ thể bao gồm thực vật và tế bào thực vật chịu được glyphosat biểu hiện polypeptit khác loại có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1.

Theo các phương án bổ sung, sáng chế mô tả phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng hoặc vùng trồng trọt có các thực vật kháng glyphosat, trong đó phương pháp này có thể bao gồm: gieo trồng thực vật hoặc hạt thực vật chứa axit nucleic mã hóa polypeptit khác loại có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 trên cánh đồng hoặc vùng trồng trọt này; và đưa một lượng vừa đủ glyphosat vào cánh đồng hoặc vùng trồng trọt này để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng mà không tác động đáng kể đến thực vật gieo trồng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các tế bào có thể tái sinh để sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật có tính kháng glyphosat. Việc nuôi cấy mô này có thể tái sinh thực vật có các đặc điểm sinh lý học và hình thái học của thực vật kháng glyphosat nêu trên, và còn tái sinh thực vật có kiểu gen gần giống như các thực vật kháng glyphosat. Các tế bào có thể tái sinh trong môi trường nuôi cấy mô này có thể là, ví dụ, phôi, thể nguyên sinh, tế bào mô phân sinh, mô sẹo, phần hoa, lá, bao phấn, rễ, đầu rễ, hoa, hạt, vỏ, và thân. Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất các thực vật được tái sinh từ môi trường nuôi cấy mô nêu trên.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào không tái sinh được để tạo ra thực vật, ví dụ, để sử dụng trong việc tạo ra các dòng tế bào thực vật kháng glyphosat. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất các thực vật chứa một phần là các tế bào này.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến việc ứng dụng nhiều thuốc diệt cỏ lên cây trồng được trồng trên vùng trồng trọt. Việc sử dụng glyphosat cùng với nhiều thuốc diệt cỏ sẽ mang lại các đặc tính diệt cỏ khác nhau, vì vậy việc phòng trừ cỏ dại được cải thiện về tính linh hoạt và kinh tế. Ví dụ, các thuốc diệt cỏ riêng lẻ có thể có thời gian tác dụng khác nhau trên vùng trồng trọt; tức là, một số thuốc diệt cỏ có thể tiếp tục tồn tại và có hiệu quả trong thời gian tương đối dài sau khi chúng được đưa vào vùng này, trong khi các thuốc diệt cỏ khác có thể bị phân hủy nhanh chóng thành các hợp chất khác và/hoặc không có hoạt tính. Hệ đưa thuốc diệt cỏ cải tiến theo các phương án cụ thể cho phép sử dụng glyphosat và nhiều thuốc diệt cỏ sao cho người trồng trọt có thể điều chỉnh việc lựa chọn các thuốc diệt cỏ cụ thể để sử dụng trong trường hợp cụ thể.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến các phương pháp và chế phẩm để tạo ra và sử dụng thực vật chịu được nhiều hơn một thuốc diệt cỏ hoặc nhóm hoặc phân nhóm thuốc diệt cỏ, như được mô tả dưới đây. Theo các phương án cụ thể, thực vật theo sáng chế chịu được cả glyphosat và ít nhất một thuốc diệt cỏ (hoặc nhóm hoặc phân nhóm thuốc diệt cỏ) khác hoặc chất hóa học (hoặc nhóm hoặc phân nhóm chất hóa học) khác (ví dụ, thuốc diệt nấm, thuốc trừ sâu, chất điều hòa sinh trưởng thực vật và các chất tương tự). Các thực vật này có thể được sử dụng trong, ví dụ, các phương pháp bao gồm việc xử lý cây trồng bằng nhiều thuốc diệt cỏ. Do đó, sáng chế đề xuất các thực vật kháng thuốc diệt cỏ chịu được việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ hoặc hỗn hợp các thuốc diệt cỏ (bao gồm hỗn hợp các thuốc diệt cỏ mà mỗi thuốc tác động nhờ cơ chế tác dụng diệt cỏ khác nhau) hoặc chịu được việc xử lý bằng hỗn hợp gồm ít nhất một thuốc diệt cỏ và ít nhất một chất hóa học khác. Theo cách này, sáng chế mô tả các phương pháp trồng cây cải tiến trong đó cỏ dại được không chế một cách chọn lọc.

Thực vật kháng thuốc diệt cỏ theo một số phương án có thể chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit khác loại truyền tính chống chịu với glyphosat và phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit truyền tính chống chịu với axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D). Theo các đoạn nêu trên, các thực vật theo sáng chế này chứa ít nhất phân tử

axit nucleic thứ ba mã hóa polypeptit truyền cho thực vật tính trạng được chọn từ nhóm bao gồm tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ; tính trạng kháng côn trùng; tính trạng nông học; tính trạng kháng bệnh; tính trạng cải biến axit béo; và tính trạng giảm phytat.

Theo một số ví dụ, thực vật kháng thuốc diệt cỏ chứa phân tử axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit truyền tính chống chịu với glyphosat và phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit truyền tính chống chịu với glufosinat. Một số ví dụ bao gồm thực vật kháng thuốc diệt cỏ chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit truyền cho thực vật tính trạng được chọn từ nhóm bao gồm tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ; tính trạng kháng côn trùng; tính trạng nông học; tính trạng kháng bệnh; tính trạng cải biến axit béo; và tính trạng giảm phytat.

Theo các ví dụ cụ thể, thực vật kháng thuốc diệt cỏ chứa phân tử axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit truyền tính chống chịu với glyphosat và phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit truyền tính chống chịu với thuốc diệt cỏ ức chế axetolactat syntaza (ALS) (Lee et al. (1988) EMBOJ. 7:1241), còn được gọi là enzym axit axetohydroxy syntaza (AHAS) (Miki et al. (1990) Theor. Appl. Genet. 80:449). Một số ví dụ bao gồm thực vật kháng thuốc diệt cỏ chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit truyền cho thực vật tính trạng được chọn từ nhóm bao gồm tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ; tính trạng kháng côn trùng; tính trạng nông học; tính trạng kháng bệnh; tính trạng cải biến axit béo; và tính trạng giảm phytat.

Theo một số phương án, axit nucleic có thể được kết hợp (hoặc “xếp chồng”) trong thực vật với phân tử axit nucleic khác bất kì, ví dụ và không bị giới hạn, để tạo ra tính kháng hoặc tính chống chịu bổ sung với glyphosat hoặc thuốc diệt cỏ khác, để tạo ra tính kháng côn trùng hoặc bệnh được chọn, để tạo ra sự tăng cường dinh dưỡng, để tạo ra các đặc tính nông học cải tiến, và để tạo ra protein hoặc sản phẩm khác hữu ích trong thức ăn, thực phẩm, các mục đích công nghiệp, mục đích dược phẩm, và/hoặc các mục đích khác. Các ví dụ bao gồm việc xếp chồng hai hoặc nhiều axit nucleic quan tâm trong hệ gen thực vật. Việc “xếp chồng gen” như vậy có thể được thực hiện thông qua việc gây giống thông thường của thực vật bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều biến thể gen, biến nạp thực vật bằng cấu trúc chứa các trình tự quan tâm, tái biến nạp thực vật chuyển gen, hoặc bổ sung các tính trạng mới qua sự hợp nhất đích thông qua sự tái tổ hợp tương đồng. Ví dụ cụ thể về việc xếp chồng này bao gồm tổ

hợp bất kì của các thành phần sau: axit nucleic *dgt-28*; axit nucleic Cry34Ab1; axit nucleic Cry35Ab1; axit nucleic Cry1F; axit nucleic Cry1Ac; axit nucleic *aad-12*; axit nucleic *aad-1*; axit nucleic *pat*; và axit nucleic *DSM-2*.

Ngoài các khía cạnh và phương án được nêu làm ví dụ được mô tả trên đây, các khía cạnh và phương án khác sẽ trở nên hiển nhiên khi nghiên cứu phần mô tả sau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện sự bắt cặp một phần trình tự của các enzym EPSP syntaza được nêu làm ví dụ (tức là DGT-28, DGT-32, DGT-33, và các enzym khác). Tất cả ba trong số các enzym DGT được nêu làm ví dụ này đều có alanin được bảo toàn ở vị trí axit amin 96 của enzym EPSP syntaza *aroA*. Vị trí của axit amin này được biểu thị bằng dấu sao, và gốc axit amin được gạch dưới.

Fig.2 thể hiện sự bắt cặp của các enzym DGT được nêu làm ví dụ (tức là DGT-1, DGT-3, và DGT-7). Vị trí của gốc axit amin đột biến đã đổi từ glyxin thành alanin được biểu thị bởi dấu sao thứ nhất. Vị trí của gốc axit amin đột biến thứ hai đã đổi từ threonin thành isoleuxin được biểu thị bởi dấu sao thứ hai. Vị trí của gốc axit amin đột biến thứ ba đã đổi từ prolin thành serin được biểu thị bởi dấu sao thứ ba.

Các Fig.3-30 thể hiện bản đồ của các plasmit khác nhau được nêu làm ví dụ: pDAB107527 (Fig. 3); pDAB105530 (Fig.4); pDAB105531 (Fig.5); pDAB105532 (Fig.6); pDAB105533 (Fig.7); pDAB105534 (Fig.8); pDAB4104 (Fig.9); pDAB102715 (Fig.10); pDAB107532 (Fig.11); pDAB107534 (Fig.12); pDAB102785 (Fig.13); pDAB100445 (Fig.14); pDAB102946 (Fig.15); pDAB100469 (Fig.16); pDAB102028 (Fig.17); pDAB102029 (Fig.18); pDAB102032 (Fig.19); pDAB102034 (Fig.20); pDAB100429 (Fig.21); pDAB100442 (Fig.22); pDAB100430 (Fig.23); pDAB102036 (Fig.24); pDAB102038 (Fig.25); pDAB102040 (Fig.26); pDAB102042 (Fig.27); pDAB107712 (Fig.28); pDAB107713 (Fig.29); và pDAB107714 (Fig.30).

Fig.31 thể hiện các giá trị IC_{50} thu được sau khi đưa các đột biến khác nhau vào trong DGT-1 (A) và DGT-7 (B) bằng cách sử dụng PEP 1 mM. Trên các đường cong IC_{50} trên cả hai Fig.31(A) và Fig.31(B), các hình tam giác đặc thể hiện kiểu dại, các vòng tròn đặc thể hiện thể đột biến GA, các ô vuông rỗng thể hiện thể đột biến GAPS, và các ô vuông đặc thể hiện thể đột biến TIPS.

Các Fig.32-46 thể hiện bản đồ của các plasmit khác nhau được nêu làm ví dụ: pDAB102719 (Fig. 32); pDAB102718 (Fig.33); pDAB107663 (Fig.34); pDAB107664 (Fig.35); pDAB107665 (Fig.36); pDAB107666 (Fig.37); pDAB109812 (Fig.38); pDAB101556 (Fig.39); pDAB107698 (Fig.40); pDAB108384 (Fig.41); pDAB108385 (Fig.42); pDAB108386 (Fig.43); pDAB108387 (Fig.44); pDAB102716 (Fig.45); pDAB102717 (Fig.46); pDAB110828 (Fig.47); pDAB110827 (Fig.48); pDAB107545 (Fig.49); pDAB107548 (Fig.50); pDAB107553 (Fig.51); pDAB102792 (Fig.52); pDAB107602 (Fig.53); và pDAB107533 (Fig.54).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Khái quát

Sáng chế đề cập đến các polypeptit mới tham gia vào quá trình chuyển hóa N-(phosphonomethyl) glyxin, và các axit nucleic mã hóa các polypeptit này. Trong một số ví dụ, polypeptit này truyền (hoặc làm tăng) tính chống chịu với glyphosat trong tế bào thực vật trong đó polypeptit này được biểu hiện khác loại, ví dụ, mà không ảnh hưởng bất lợi đến gắn kết của EPSP syntaza với cơ chất tự nhiên của nó, phosphoenolpyruvat (PEP).

II. Các thuật ngữ

Để làm rõ hơn phạm vi của sáng chế này, các định nghĩa, thuật ngữ, và từ viết tắt cụ thể có nghĩa như sau.

Trừ khi được định nghĩa cụ thể khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình có trình độ trung bình trong lĩnh vực. Trừ khi được chỉ rõ khác trong ngữ cảnh mà nó xuất hiện, thuật ngữ ở dạng số ít sẽ bao gồm cả dạng số nhiều, và thuật ngữ ở dạng số nhiều được hiểu là bao gồm cả dạng số ít. Do đó, mạo từ bất định “a” và “an” trong bản mô tả tiếng Anh được sử dụng đứng trước phần tử hoặc hợp phần là không hạn chế về số lượng trường hợp (tức là sự xuất hiện) của phần tử hoặc hợp phần này. Khi khoảng của các giá trị số được nêu trong bản mô tả này (ví dụ, “nhỏ hơn khoảng X,” “nhỏ hơn X,” và “ví dụ, X_1 ... và X_2 ”), thì khoảng này được hiểu là bao gồm tất cả các giá trị và khoảng giá trị nằm trong khoảng được nêu, như thể các giá trị và khoảng này được nêu rõ ràng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “bao gồm,” “kể cả,” “có,” và “chứa,” và các biến thể của chúng, có kết thúc mở (tức là không loại trừ). Ví dụ, chế phẩm hoặc phương pháp bao gồm một danh sách các phần tử không nhất thiết chỉ giới hạn ở các phần tử đó. Chế phẩm hoặc phương pháp này có thể (hoặc có thể không) bao gồm các phần tử khác không được liệt kê cụ thể hoặc vốn có đối với chế phẩm hoặc phương pháp này. Ngoài ra, trừ khi có chỉ dẫn ngược lại, “hoặc” được sử dụng với nghĩa bao gồm (và không loại trừ). Ví dụ, điều kiện “A hoặc B” được thỏa mãn trong trường hợp bất kì sau: A là đúng (hoặc có mặt) và B là sai (hoặc không có mặt); A là sai (hoặc không có mặt) và B là đúng (hoặc có mặt); và cả hai A và B đều đúng (hoặc có mặt).

Thực vật: Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “thực vật” bao gồm toàn bộ thực vật và con cháu, tế bào, mô, hoặc phần bất kì của thực vật. Thuật ngữ “phần thực vật” bao gồm (các) phần bất kì của thực vật, bao gồm, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: hạt (bao gồm hạt trưởng thành và hạt chưa trưởng thành); cành giâm thực vật; tế bào thực vật; môi trường nuôi cấy tế bào thực vật; cơ quan thực vật (ví dụ, phần hoa, phôi, hoa, quả, cành non, lá, rễ, thân, và mảnh cây). Mô thực vật hoặc cơ quan thực vật có thể là hạt, thể nguyên sinh, mô sẹo, hoặc nhóm tế bào thực vật khác bất kì được tổ chức vào đơn vị cấu trúc hoặc chức năng. Tế bào thực vật hoặc môi trường nuôi cấy mô có thể có khả năng tái sinh thực vật với các đặc điểm sinh lý học và hình thái học của thực vật mà từ đó tế bào hoặc mô này được lấy, và tái sinh thực vật có kiểu gen gần giống như thực vật này. Ngược lại, một số tế bào thực vật không có khả năng tái sinh để tạo ra thực vật. Các tế bào có thể tái sinh trong tế bào thực vật hoặc môi trường nuôi cấy mô có thể là phôi, thể nguyên sinh, tế bào mô phân sinh, mô sẹo, phần hoa, lá, bao phấn, rễ, đầu rễ, râu, hoa, nhân, tai, lõi, vỏ, hoặc cuống.

Các phần thực vật bao gồm các phần có thể thu hoạch và các phần hữu ích để nhân giống các thực vật con cháu. Các phần thực vật hữu ích để nhân giống bao gồm, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: hạt; quả; cành giâm; cây con; thân củ; và thân rễ. Phần có thể thu hoạch của thực vật có thể là phần thực vật hữu ích bất kì, bao gồm, ví dụ và không chỉ giới hạn ở: hoa; phần hoa; cây con; thân củ; lá; thân; quả; hạt; và rễ.

Tế bào thực vật là đơn vị cấu trúc và sinh lý học của thực vật, bao gồm thể nguyên sinh và thành tế bào. Tế bào thực vật có thể ở dạng đơn bào được phân lập, hoặc tập hợp các tế bào (ví dụ, mô sẹo xộp và tế bào được nuôi cấy), và có thể là một

phần của đơn vị được tổ chức cao hơn (ví dụ, mô thực vật, cơ quan thực vật, và thực vật). Do đó, tế bào thực vật có thể là thể nguyên sinh, tế bào sinh giao tử, hoặc tế bào hoặc tập hợp tế bào có thể tái tạo thành thực vật hoàn chỉnh. Như vậy, hạt, bao gồm nhiều tế bào thực vật và có khả năng tái sinh thành thực vật hoàn chỉnh, được coi là “tế bào thực vật” theo các phương án trong bản mô tả này.

Tính kháng/tính chống chịu thuốc diệt cỏ: Khi đề cập đến thực vật kháng hoặc chịu được glyphosat, có nghĩa là việc đưa một lượng glyphosat vào thực vật này không có tác động đáng kể hoặc làm chết thực vật này, trong khi đó thực vật kiểu dại thuộc cùng loài sẽ bị tác động đáng kể và/hoặc bị chết khi đưa một lượng glyphosat này vào. Thực vật có thể chịu được thuốc diệt cỏ cụ thể một cách tự nhiên, hoặc thực vật có thể được làm cho có tính chịu thuốc diệt cỏ bằng kỹ thuật di truyền, ví dụ, sinh sản chọn lọc; biến nạp di truyền; và/hoặc đưa gen chuyển vào trong hệ gen của thực vật. “Thực vật kháng glyphosat” được dùng để chỉ thực vật chứa polypeptit hoặc phân tử axit nucleic có thể truyền tính chống chịu thuốc diệt cỏ khi được đưa vào thực vật khác loại hoặc sinh vật khác biểu hiện nó (tức là, làm cho thực vật hoặc sinh vật khác chịu được thuốc diệt cỏ).

Thực vật kháng hoặc chịu được glyphosat có thể chịu một số ảnh hưởng tối thiểu từ việc đưa glyphosat vào thực vật. Ví dụ, ảnh hưởng này có thể là làm biến đổi sự sinh trưởng và phát triển bình thường của thực vật, trong đó thực vật này có thể có dấu hiệu hoặc triệu chứng liên quan đến điều kiện bất lợi hoặc bệnh. Ảnh hưởng tối thiểu do việc đưa glyphosat vào thực vật kháng hoặc chịu được glyphosat như vậy là ngược với ảnh hưởng bất lợi gây ra do việc đưa glyphosat vào các thực vật mẫn cảm với glyphosat. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể phân biệt giữa các thực vật có tính kháng glyphosat và các thực vật mẫn cảm với glyphosat. Việc đưa glyphosat vào thực vật chứa axit nucleic truyền tính chống chịu glyphosat dẫn đến ảnh hưởng ít hơn đáng kể so với việc đưa cùng một lượng glyphosat vào thực vật cùng loài mà không chứa phân tử axit nucleic truyền tính chống chịu glyphosat.

Thực vật chịu được thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác thể hiện tính chống chịu tốt hơn so với thực vật đối chứng phù hợp. Mức độ phá hủy gây ra do việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác có thể được đánh giá bằng cách ước lượng thông số bất kỳ về sự sinh trưởng hoặc tình trạng khỏe mạnh của thực vật. Các thông số này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và việc chọn lọc chúng

là tùy theo chủ ý của người có hiểu biết trung bình kỹ thuật. Mức độ phá hủy thực vật có thể được đánh giá bằng cách kiểm tra bằng mắt và/hoặc bằng cách phân tích thống kê một hoặc nhiều (các) thông số phù hợp về sự sinh trưởng hoặc tình trạng khỏe mạnh của thực vật ở các thực vật hoặc (các) nhóm thực vật riêng lẻ. Do đó, mức độ phá hủy có thể được đánh giá bằng cách ước lượng các thông số bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: chiều cao thực vật; khối lượng thực vật; màu lá; chiều dài lá; sự ra hoa; khả năng sinh sản; trổ râu; năng suất; và sự sản xuất hạt. Mức độ phá hủy cũng có thể được đánh giá bằng cách ước lượng thời gian tính đến giai đoạn phát triển cụ thể (ví dụ, trổ râu, ra hoa, và thụ phấn), hoặc thời gian tính đến khi thực vật hồi phục lại sau khi xử lý bằng chất hóa học và/hoặc thuốc diệt cỏ cụ thể.

Trong quá trình đánh giá mức độ phá hủy, các giá trị có thể được ấn định cho các mức độ phá hủy cụ thể sao cho phân tích thống kê hoặc so sánh định lượng có thể thực hiện được. Việc sử dụng các khoảng giá trị để mô tả các mức độ phá hủy cụ thể là đã biết trong lĩnh vực, và khoảng hoặc thang thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng. Ví dụ, điểm tổn thương do thuốc diệt cỏ (cũng được gọi là điểm chống chịu) có thể được ấn định. Do đó, tính chống chịu thuốc diệt cỏ cũng có thể được biểu thị bởi các định mức khác trong thang này, trong đó thực vật đối chứng (hoặc nhóm thực vật đối chứng) thích hợp có điểm thống kê thấp hơn trên thang này khi đáp ứng với việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ so với nhóm thực vật thử nghiệm.

Mức độ phá hủy gây ra do thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác có thể được đánh giá ở các thời điểm khác nhau sau khi thực vật đã được xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Thông thường, mức độ phá hủy được đánh giá ở quanh thời điểm mà thực vật đối chứng có mức độ phá hủy tối đa. Đôi khi, mức độ phá hủy được đánh giá sau một khoảng thời gian mà thực vật đối chứng không được xử lý bằng thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác được sinh trưởng và/hoặc phát triển ở mức đo được so với kích thước hoặc giai đoạn mà việc xử lý được dùng. Mức độ phá hủy có thể được đánh giá ở nhiều thời điểm thích hợp bất kỳ, ví dụ, ở 12 giờ; ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, và/hoặc 14 ngày; ở 3 và/hoặc 4 tuần; hoặc dài hơn, sau khi thực vật thử nghiệm được xử lý bằng thuốc diệt cỏ. Thời điểm đánh giá bất kỳ là phù hợp miễn là nó cho phép phát hiện sự khác biệt trong đáp ứng với việc xử lý thực vật thử nghiệm và đối chứng.

Thuốc diệt cỏ không “tác động đáng kể” đến thực vật khi nó không có tác dụng lên thực vật, hoặc khi nó có một số tác dụng lên thực vật nhưng sau đó thực vật hồi phục lại được, hoặc khi tác dụng có hại của nó lên thực vật được bù trừ, ví dụ, bởi tác động khác của thuốc diệt cỏ cụ thể lên cỏ dại. Do đó, ví dụ, cây trồng có thể không “bị tác động một cách đáng kể” bởi thuốc diệt cỏ hoặc biện pháp xử lý khác nếu thực vật này có mức độ giảm ít hơn 25%, ít hơn 20%, ít hơn 15%, ít hơn 10%, ít hơn 9%, ít hơn 8%, ít hơn 7%, ít hơn 6%, ít hơn 5%, ít hơn 4%, ít hơn 3%, ít hơn 2%, hoặc ít hơn 1% trong ít nhất một thông số thích hợp chỉ báo sức khỏe và/hoặc năng suất của thực vật, so với thực vật đối chứng phù hợp (ví dụ, thực vật không được xử lý thuộc cùng loài). Theo các phương án cụ thể, thực vật chịu được thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác nếu nó có mức độ phá hủy so với thực vật đối chứng phù hợp nhỏ hơn mức độ phá hủy được biểu hiện bởi thực vật đối chứng là ít nhất 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, hoặc 1000% hoặc lớn hơn. Cây trồng không bị tác động đáng kể bởi thuốc diệt cỏ hoặc biện pháp xử lý khác có thể có mức độ giảm ở ít nhất một thông số, nhưng mức độ giảm này có tính chất tạm thời, và thực vật hồi phục hoàn toàn trong vòng, ví dụ, khoảng 1 tuần, khoảng 2 tuần, khoảng 3 tuần, khoảng 4 tuần, hoặc khoảng 6 tuần. Theo các phương án cụ thể, thực vật chịu được thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác có thể được đặc trưng bởi tình trạng thực vật không bị tác động đáng kể bởi việc đưa thuốc diệt cỏ hoặc chất hóa học khác vào.

Các thông số thích hợp chỉ báo sức khỏe và/hoặc năng suất của thực vật bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: chiều cao thực vật; khối lượng thực vật; chiều dài lá; thời gian tính đến giai đoạn phát triển cụ thể; sự ra hoa; năng suất; và sự sản xuất hạt. Việc đánh giá thông số có thể được thực hiện bằng cách kiểm tra bằng mắt và/hoặc bằng cách phân tích thống kê thông số này. Khi đã đánh giá ở thực vật thử nghiệm và thực vật đối chứng, tiến hành so sánh để xác định xem thực vật thử nghiệm có bị tác động đáng kể bởi thuốc diệt cỏ hoặc biện pháp xử lý khác hay không.

Thực vật đối chứng thích hợp có thể được sử dụng để xác định tính kháng thuốc diệt cỏ (hoặc chất hóa học khác) bao gồm các thực vật thuộc cùng loài không chứa axit nucleic và/hoặc polypeptit khác loại được cho là chịu được thuốc diệt cỏ, và các thực vật có chứa axit nucleic và/hoặc polypeptit khác loại được cho là chịu được thuốc diệt cỏ, nhưng chưa được xử lý bằng thuốc diệt cỏ.

Thuốc diệt cỏ: “Thuốc diệt cỏ” là chất hóa học gây tổn thương tạm thời hoặc vĩnh viễn đối với thực vật. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các thuốc diệt cỏ được liệt kê và mô tả chi tiết hơn ở đâu đó nữa trong bản mô tả này. Thuốc diệt cỏ có thể được kết hợp vào thực vật hoặc các tế bào của nó, hoặc nó có thể tác động lên thực vật hoặc tế bào mà không cần kết hợp. “Hoạt chất” là chất hóa học trong chế phẩm thuốc diệt cỏ đảm nhiệm tính gây độc thực vật của chế phẩm này. Hoạt chất trong các chế phẩm thuốc diệt cỏ thương mại thường được nhận diện là hoạt chất trên nhãn sản phẩm. Thông tin trên nhãn sản phẩm có thể tìm được ở Cơ quan bảo vệ môi sinh Hoa Kỳ (U.S. Environmental Protection Agency), và được cập nhật trực tuyến tại oaspub.epa.gov/pestlabl/ppls.own. Thông tin trên nhãn sản phẩm cũng có thể tìm được trực tuyến tại www.cdms.net.

Khi được sử dụng liên quan đến thuốc diệt cỏ, thuật ngữ “đương lượng axit” được dùng để chỉ mức độ hoặc lượng dưới dạng axit gốc có hoạt tính diệt cỏ.

Được phân lập: Thành phần sinh học được “phân lập” (như axit nucleic hoặc polypeptit) là thành phần đã được tách gần hết, được tạo ra tách rời, hoặc được tinh chế khỏi các thành phần sinh học khác trong tế bào sinh vật mà thành phần này có trong tự nhiên (tức là, ADN và ARN nhiễm sắc thể và ngoài nhiễm sắc thể khác, và các protein), đồng thời gây ra sự thay đổi hóa học hoặc chức năng của thành phần này (ví dụ, axit nucleic có thể được phân lập từ nhiễm sắc thể bằng cách phá vỡ liên kết hóa học nối axit nucleic với ADN còn lại trong nhiễm sắc thể này). Phân tử axit nucleic và protein đã “phân lập” bao gồm phân tử axit nucleic và protein được tinh chế bằng các phương pháp tinh chế chuẩn. Thuật ngữ này còn bao hàm các axit nucleic và protein được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào vật chủ, cũng như các phân tử axit nucleic, protein, và peptit được tổng hợp hóa học.

Axit nucleic: Các thuật ngữ “polynucleotit,” “axit nucleic,” và “phân tử axit nucleic” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, và bao gồm axit nucleic ở số ít; axit nucleic ở số nhiều; mảnh axit nucleic, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó; và cấu trúc axit nucleic (ví dụ, ARN thông tin (mARN) và ADN plasmit (pADN)). Polynucleotit hoặc axit nucleic có thể chứa trình tự nucleotit của trình tự cADN (ADN bổ trợ) có chiều dài đầy đủ, hoặc mảnh của nó, bao gồm các trình tự 5' và/hoặc 3' không được dịch mã và (các) trình tự mã hóa. Polynucleotit hoặc axit nucleic có thể bao gồm polyribonucleotit hoặc polydeoxyribonucleotit bất kỳ, có thể bao gồm

ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit chưa được cải biến hoặc ribonucleotit hoặc deoxyribonucleotit được cải biến. Ví dụ, polynucleotit hoặc axit nucleic có thể bao gồm ADN sợi đơn và sợi kép; ADN là hỗn hợp gồm các vùng sợi đơn và sợi kép; ARN sợi đơn và sợi kép; và ARN là hỗn hợp gồm các vùng sợi đơn và sợi kép. Các phân tử lai chứa ADN và ARN có thể là sợi đơn, sợi kép, hoặc hỗn hợp gồm các vùng sợi đơn và sợi kép. Các thuật ngữ nêu trên còn bao gồm các dạng được cải biến bằng hóa học, enzym, và chuyển hóa của polynucleotit hoặc axit nucleic.

Cần hiểu rằng ADN cụ thể cũng dùng để chỉ phần bổ sung của nó, trình tự của nó được xác định theo quy tắc tạo cặp bazơ deoxyribonucleotit.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gen” được dùng để chỉ axit nucleic mã hóa sản phẩm chức năng (ARN hoặc polypeptit/protein). Gen có thể bao gồm trình tự điều hòa trước (trình tự không mã hóa 5') và/hoặc sau (trình tự không mã hóa 3') trình tự mã hóa sản phẩm chức năng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự mã hóa” được dùng để chỉ trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin cụ thể. “Trình tự điều hòa” được dùng để chỉ trình tự nucleotit nằm phía trước (ví dụ, trình tự không mã hóa 5'), ở trên, hoặc phía sau (ví dụ, trình tự không mã hóa 3') của trình tự mã hóa, ảnh hưởng đến sự phiên mã, việc xử lý ARN hoặc tính ổn định, hoặc sự dịch mã của trình tự mã hóa liên quan. Các trình tự điều hòa bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: trình tự khởi động; trình tự dẫn đầu dịch mã; intron; trình tự nhận biết polyadenyl hóa; vị trí xử lý ARN; vị trí gắn kết cơ quan phản ứng lại kích thích; và cấu trúc vòng thân.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự thoái hóa codon” chỉ sự trùng lặp trong mã di truyền cho phép biến đổi trình tự nucleotit cụ thể mà không ảnh hưởng đến trình tự axit amin của polypeptit được mã hóa. Vì mỗi codon bao gồm ba nucleotit, và các nucleotit chứa ADN được giới hạn ở bốn bazơ cụ thể, có 64 tổ hợp nucleotit có thể mã hóa, trong số chúng 61 tổ hợp mã hóa các axit amin (ba codon còn lại mã hóa tín hiệu kết thúc dịch mã). Kết quả là, nhiều axit amin được chỉ định bởi nhiều hơn một codon. Ví dụ, các axit amin alanin và prolin được mã hóa bởi bốn bộ ba, serin và arginin bởi sáu bộ ba, còn tryptophan và metionin được mã hóa bởi chỉ một bộ ba. “Mã di truyền” thể hiện codon nào mã hóa axit amin nào là đã biết phổ biến trong lĩnh vực. Sự thoái hóa trong trường hợp này cho phép các bazơ của ADN thay

đổi trong khoảng rộng mà không làm biến đổi trình tự axit amin của các protein được mã hóa bởi ADN này.

Theo một số phương án trong bản mô tả này, khi thiết kế trình tự mã hóa để cải thiện sự biểu hiện trong tế bào vật chủ, thì gen được thiết kế sao cho tần suất sử dụng codon trong trường hợp này gần với tần suất sử dụng codon ưu tiên của tế bào vật chủ. Do đó, thuật ngữ “tối ưu hóa về codon” chỉ các gen hoặc các trình tự mã hóa của axit nucleic để biến nạp trong các vật chủ khác nhau, trong đó các codon trong gen hoặc trình tự mã hóa này đã được biến đổi để phản ánh cách sử dụng codon điển hình của sinh vật chủ mà không làm biến đổi polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic này. Trong các ví dụ, việc tối ưu hóa như vậy bao gồm thay thế ít nhất một, nhiều hơn một, một số đáng kể, và/hoặc tất cả các codon trong gen hoặc trình tự mã hóa bằng một hoặc nhiều codon được sử dụng phổ biến hơn trong gen của sinh vật đó.

Nhiều sinh vật có xu hướng sử dụng các codon cụ thể để mã hóa việc cài xen axit amin cụ thể vào chuỗi peptit đang tổng hợp. Sự ưu tiên codon, hoặc xu hướng sử dụng codon, các khác biệt trong việc sử dụng codon giữa các sinh vật, được tạo ra bởi sự thoái hóa mã di truyền, và được dẫn chứng bằng tài liệu trong số nhiều sinh vật. Xu hướng sử dụng codon thường liên quan đến hiệu quả dịch mã của ARN thông tin (mARN), điều này được cho là tùy thuộc vào, trong số đó, các đặc tính của codon cần dịch mã và sự có sẵn phân tử ARN vận chuyển (tARN) cụ thể. Ưu thế của các tARN được chọn trong tế bào là phản ánh chung các codon được sử dụng phổ biến nhất trong việc tổng hợp peptit. Do đó, các gen có thể được biến đổi hoặc thiết kế để biểu hiện gen tối ưu trong sinh vật đã cho dựa trên sự tối ưu hóa về codon.

Dựa vào một số lượng lớn các trình tự gen có sẵn đối với nhiều loài động vật, thực vật và vi sinh vật, có thể tính toán tần suất sử dụng codon tương đối. Các bảng sử dụng codon đã có sẵn ở, ví dụ, “Codon Usage Database” trên mạng Internet tại kazusa.or.jp/codon/, và các bảng này có thể được làm phù hợp theo một số cách. Xem Nakamura et al. (2000) Nucl. Acids Res. 28:292. Bằng cách dùng bảng sử dụng codon, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể áp dụng tần suất tương ứng với loài đã cho vào trình tự polypeptit đã cho bất kì, để thiết kế và sản xuất mảnh axit nucleic tổng hợp của vùng mã hóa được tối ưu hóa về codon mã hóa polypeptit này, nhưng sử dụng các codon tối ưu đối với loài này.

Xu hướng sử dụng codon được phản ánh ở thành phần bazơ trung bình của vùng mã hóa protein. Ví dụ, sinh vật có hệ gen với lượng G+C tương đối thấp dùng nhiều codon có A hoặc T ở vị trí thứ ba của các codon đồng nghĩa hơn, còn sinh vật có hệ gen với lượng G+C cao hơn dùng nhiều codon có G hoặc C ở vị trí thứ ba hơn. Ngoài ra, cho rằng sự có mặt của codon “hiếm” trong mARN có thể làm giảm mức độ dịch mã tuyệt đối của mARN đó, đặc biệt là khi lượng tương đối của tARN được vận chuyển tương ứng với codon hiếm là thấp. Sự mở rộng suy luận này là việc giảm mức độ dịch mã bởi các codon hiếm riêng rẽ ít nhất sẽ bổ sung cho nhiều codon hiếm. Do đó, các mARN có lượng codon hiếm tương đối cao sẽ có mức độ dịch mã thấp tương ứng. Mức độ này có thể được phản ánh bởi một lượng thấp tương ứng của protein được mã hóa.

Xu hướng sử dụng codon có thể được tính dưới dạng tần suất mà ở đó codon đơn được sử dụng so với các codon mã hóa tất cả các axit amin. Theo cách khác, xu hướng sử dụng codon có thể được tính dưới dạng tần suất mà ở đó codon đơn được sử dụng để mã hóa axit amin cụ thể, so với tất cả các codon khác để mã hóa axit amin đó (các codon đồng nghĩa).

Thuật ngữ “phần trăm đồng nhất” (hoặc “% đồng nhất”) được dùng để chỉ mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự polypeptit (hoặc trình tự polynucleotit), khi được xác định bằng cách so sánh trình tự. Phần trăm đồng nhất có thể thể hiện mức độ liên quan trình tự giữa trình tự polypeptit (hoặc polynucleotit), khi được xác định bằng cách khớp giữa các chuỗi của các trình tự này. Nói chung, độ đồng nhất chỉ sự tương ứng chính xác giữa nucleotit với nucleotit hoặc axit amin với axit amin lần lượt của hai trình tự polynucleotit hoặc polypeptit. Phần trăm đồng nhất của hai trình tự, dù trình tự axit nucleic hoặc axit amin, được tính bằng cách lấy số lượng khớp chính xác giữa hai trình tự được bắt cặp chia cho chiều dài của trình tự ngắn hơn và nhân với 100. Xem Russell and Barton (1994) *J. Mol. Biol.* 244:332-50.

Các kỹ thuật để bắt cặp các trình tự axit nucleic và axit amin và xác định độ đồng nhất là đã biết trong lĩnh vực này, và bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở, các kỹ thuật được nêu trong: *Computational Molecular Biology* (1988) (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University, NY; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (1993) (Smith, D. W., Ed.) Academic, NY; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I* (1994) (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., Eds.) Humana, NJ; *Sequence Analysis in Molecular*

Biology (1987) (von Heinje, G., Ed.) Academic, NY; và Sequence Analysis Primer (1991) (Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.) Stockton, NY. Kỹ thuật xác định phần trăm đồng nhất giữa hai trình tự có thể bao gồm cung cấp trình tự nucleotit của mRNA hoặc gen và/hoặc cung cấp hoặc suy luận trình tự axit amin được mã hóa từ đó, và so sánh (các) trình tự này với trình tự nucleotit và/hoặc axit amin thứ hai. Các trình tự của hệ gen cũng có thể được xác định và so sánh theo kiểu này.

Ngoài ra, các phương pháp để bắt cặp các trình tự axit nucleic và axit amin và xác định độ đồng nhất được đưa vào nhiều chương trình phần mềm máy tính khác nhau được công bố công khai. Việc bắt cặp trình tự và tính phần trăm đồng nhất có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình AlignX™ của Vector NTI® suite (Invitrogen, Carlsbad, CA) hoặc chương trình MegAlign™ của LASERGENE™ bioinformatics computing suite (DNASTAR™ Inc., Madison, WI). Bắt cặp đa trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp Clustal™, bao gồm một số loại thuật toán bắt cặp, gồm Clustal™ V và Clustal™ W (Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Higgins et al. (1992) Comput. Appl. Biosci. 8:189-91). Đối với bắt cặp đa trình tự trong Clustal™ V, các giá trị mặc định có thể được sử dụng bao gồm Điểm phạt khoảng trống=10 và Điểm phạt chiều dài khoảng trống=10. Các thông số mặc định để bắt cặp đa trình tự trong Clustal™ W bao gồm (Điểm phạt khoảng trống (GAP PENALTY)=10, Điểm phạt chiều dài khoảng trống (GAP LENGTH PENALTY)=0,2, Trình tự phân kỳ trễ (Delay Divergent Seqs)(%)=30, Trọng số chuyển tiếp ADN (DNA Transition Weight)=0,5, Ma trận trọng số protein (Protein Weight Matrix)=chuỗi Gonnet (Gonnet Series), Ma trận trọng số ADN (DNA Weight Matrix)=IUB). Các thông số mặc định để bắt cặp từng đôi và tính phần trăm đồng nhất giữa các trình tự protein có thể được sử dụng trong phương pháp Clustal™ là KTUPLE (chuỗi trình tự con)=1, GAP PENALTY (Điểm phạt khoảng trống)=3, WINDOW (Cửa sổ)=5, và DIAGONALS SAVED=5. Đối với axit nucleic, các thông số mặc định này có thể là KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4, và DIAGONALS SAVED=4. Sau khi bắt cặp trình tự bằng cách sử dụng chương trình Clustal™, có thể thu được “phần trăm đồng nhất” bằng cách xem xét bảng “khoảng cách trình tự” trong cùng chương trình.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất trình tự (khi so sánh với polypeptit tham chiếu; ví dụ, polypeptit DGT) là, ví dụ và không giới

hạn ở: ít nhất khoảng 55%; ít nhất khoảng 60%; ít nhất khoảng 65%; ít nhất khoảng 70%; ít nhất khoảng 75%; ít nhất khoảng 80%; ít nhất khoảng 85%; ít nhất khoảng 90%; và ít nhất khoảng 95%, có chức năng giống hoặc tương tự như polypeptit tham chiếu. Do đó, phần trăm đồng nhất dạng số nguyên bất kỳ nằm trong khoảng từ, ví dụ, 55% đến 100% có thể hữu ích trong việc mô tả axit nucleic cụ thể trong bản mô tả này, ví dụ và không giới hạn ở: 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, và 99%. Các mảnh axit nucleic nhất định không chỉ có độ đồng nhất trình tự như trên, mà có thể mã hóa polypeptit có, ví dụ và không giới hạn ở: ít nhất 50 axit amin; ít nhất 100 axit amin; ít nhất 150 axit amin; ít nhất 200 axit amin; và ít nhất 250 axit amin. Các phương án cụ thể bao gồm axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất khoảng 90% so với SEQ ID NO:1 (ví dụ, độ đồng nhất ít nhất khoảng 89%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 90%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 91%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 92%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 93%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 94%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 95%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 96%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 97%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 98%; độ đồng nhất ít nhất khoảng 99%; và độ đồng nhất ít nhất khoảng 99,5%).

Thuật ngữ “phần mềm phân tích trình tự” được dùng để chỉ thuật toán hoặc chương trình phần mềm máy tính hữu ích để phân tích trình tự nucleotit hoặc axit amin. “Phần mềm phân tích trình tự” có thể có trên thị trường hoặc được nghiên cứu một cách độc lập. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về phần mềm phân tích trình tự bao gồm: GCG suite of programs (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); BLASTP™, BLASTN™, và BLASTX™ (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10); DNASTAR™ (DNASTAR™, Inc. Madison, WI); Sequencher™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); và chương trình FASTA™ kết hợp thuật toán Smith-Waterman (Pearson (1994) Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.], Meeting Date 1992 (Suhai and Sandor, Eds.), Plenum: New York, NY, pp. 111-20). Khi phần mềm phân tích trình tự được sử dụng để phân tích trình tự nucleotit hoặc axit amin trong bản mô tả này, thì các kết quả phân tích thu được được tạo ra bằng cách sử dụng các giá trị mặc định của chương trình tham khảo, trừ khi được chỉ rõ. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ

“các giá trị mặc định” được dùng để chỉ tập hợp các giá trị hoặc các thông số được nhập đầu tiên vào phần mềm phân tích trình tự khi nó được thiết lập từ đầu.

Tạo thể lai: Axit nucleic chứa tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit có thể được sử dụng làm đoạn dò “lai” một cách chọn lọc với các trình tự nucleotit có mặt trong quần thể các mảnh ADN hệ gen tách dòng hoặc các mảnh cADN (ADN bổ trợ) (ví dụ, thư viện ADN hệ gen hoặc bổ trợ từ sinh vật được chọn) có độ đồng nhất trình tự đáng kể với trình tự đoạn dò. Đoạn dò lai có thể là mảnh ADN hệ gen; mảnh ADN plasmit; mảnh cADN; mảnh ARN; mảnh ADN được khuếch đại bằng PCR (Polymerase chain reaction - Phản ứng chuỗi polymeraza); oligonucleotit; hoặc polynucleotit khác, và đoạn dò có thể được đánh dấu bằng nhóm dễ phát hiện (ví dụ, ^{32}P), hoặc chất đánh dấu dễ phát hiện khác bất kì. Do đó, ví dụ và không giới hạn ở, đoạn dò để lai có thể được tạo ra bằng cách đánh dấu oligonucleotit tổng hợp lai đặc hiệu với axit nucleic trong bản mô tả này (ví dụ, axit nucleic có độ đồng nhất ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1). Các phương pháp tạo ra đoạn dò để lai, và để cấu trúc thư viện cADN và hệ gen, là đã biết trong lĩnh vực này. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Hướng dẫn bao quát về việc tạo thể lai của các axit nucleic có thể được tìm thấy trong Sambrook và các đồng tác giả (1989), nêu trên; và Ausubel et al. (1997) *Short Protocols in Molecular Biology*, Third Edition, Wiley, NY, New York, pp. 2-40.

Theo một số phương án, việc tạo thể lai axit nucleic (ví dụ, với ADN được khuếch đại) có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của biến cố chuyển gen trong mẫu. Các phân tử hoặc mảnh axit nucleic của chúng có khả năng “lai đặc hiệu” với phân tử axit nucleic khác trong một số trường hợp. Trong một số ví dụ, axit nucleic lai đặc biệt trong các điều kiện nghiêm ngặt với axit nucleic đích. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, hai các phân tử axit nucleic được cho là có khả năng lai đặc hiệu với nhau nếu hai phân tử này có khả năng tạo ra cấu trúc axit nucleic sợi kép đối song song trong điều kiện nghiêm ngặt (ví dụ, độ nghiêm ngặt cao).

Axit nucleic được cho là “bổ sung” phân tử axit nucleic khác nếu hai phân tử axit nucleic này biểu hiện tính bổ sung trình tự hoàn toàn. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, các axit nucleic được cho là có “tính bổ sung hoàn toàn” khi mỗi nucleotit của một trong các phân tử là bổ sung cho nucleotit của phân tử kia. Các phân tử có tính bổ sung hoàn toàn thường sẽ lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng vẫn được

gắn với nhau trong điều kiện "nghiêm ngặt cao" thông thường. Điều kiện nghiêm ngặt cao thông thường được mô tả bởi Sambrook và các đồng tác giả (1989), nêu trên.

Hai phân tử được cho là có “tính bổ sung tối thiểu” nếu chúng có thể lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng vẫn gắn với nhau ít nhất là trong điều kiện "nghiêm ngặt thấp" thông thường. Điều kiện nghiêm ngặt thấp thông thường được mô tả bởi Sambrook và các đồng tác giả (1989), nêu trên. Để cho phân tử axit nucleic có chức năng như đoạn môi hoặc đoạn dò, nó chỉ cần có tính bổ sung trình tự tối thiểu để có thể tạo ra cấu trúc sợi kép ổn định trong dung môi cụ thể và nồng độ muối được dùng.

Các yếu tố ảnh hưởng đến tính nghiêm ngặt của việc tạo thể lai là đã biết rõ đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ: nhiệt độ; độ pH; cường độ ion; và nồng độ dung môi hữu cơ (ví dụ, formamit và dimethylsulfoxit). Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, tính nghiêm ngặt của việc tạo thể lai tăng lên khi nhiệt độ cao hơn, cường độ ion thấp hơn, và nồng độ dung môi thấp hơn. Các điều kiện nghiêm ngặt cũng có thể đạt được bằng cách bổ sung các chất làm mất ổn định như formamit.

Thuật ngữ “điều kiện nghiêm ngặt” hoặc “các điều kiện nghiêm ngặt” được định nghĩa liên quan đến việc tạo thể lai của một axit nucleic với một axit nucleic đích khác (tức là, với phân tử axit nucleic chứa trình tự nucleotit cụ thể cần quan tâm) bằng quy trình lai cụ thể được bàn luận trong Sambrook và các đồng tác giả (1989), nêu trên (ở 9.52-9.55). Cũng xem Sambrook và các đồng tác giả (1989) ở 9.47-9.52 và 9.56-9.58.

Tính đặc hiệu trong nhiều ứng dụng có liên quan đến các điều kiện rửa sau khi tạo thể lai, trong đó các yếu tố bao gồm cường độ ion và nhiệt độ của dung dịch rửa. Đối với thể lai ADN-ADN, điểm chảy nhiệt (T_m) có thể được ước tính từ phương trình:

$$T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61(\%\text{form}) - 500/L, \quad (1)$$

trong đó M là nồng độ phân tử gam của cation hóa trị một, %GC là tỷ lệ phần trăm của các nucleotit guanisin và xytoxin trong ADN, % form là tỷ lệ phần trăm của formamit trong dung dịch lai, và L là chiều dài của thể lai trong cặp bazơ. Meinkoth and Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-84.

T_m là nhiệt độ (ở cường độ ion và độ pH cụ thể) mà ở đó 50% trình tự đích bổ sung lai với đoạn dò được khớp hoàn toàn. T_m giảm xuống 1°C đối với mỗi 1% không khớp. Do đó, T_m , các điều kiện lai, và/hoặc rửa có thể được điều chỉnh để lai các trình tự có độ đồng nhất mong muốn. Ví dụ, nếu việc lai các trình tự có độ đồng nhất 90% được tìm thấy, thì T_m có thể bị giảm 10°C (ở cường độ ion và độ pH cụ thể). Các điều kiện nghiêm ngặt có thể được chọn, ví dụ, thấp hơn 5°C so với điểm chảy nhiệt (T_m) của trình tự cụ thể và trình tự bổ sung của nó ở cường độ ion và độ pH xác định. Tuy nhiên, các điều kiện nghiêm ngặt khắt khe có thể sử dụng nhiệt độ tạo thể lai và/hoặc rửa thấp hơn 1, 2, 3, hoặc 4°C so với T_m ; các điều kiện nghiêm ngặt trung bình có thể sử dụng nhiệt độ tạo thể lai và/hoặc rửa thấp hơn 6, 7, 8, 9, hoặc 10°C so với T_m ; các điều kiện nghiêm ngặt thấp có thể sử dụng nhiệt độ tạo thể lai và/hoặc rửa thấp hơn 11 đến 20°C so với T_m .

Trong một số ví dụ, các điều kiện nghiêm ngặt là điều kiện trong đó nồng độ muối nhỏ hơn 1,5 M Na^+ (ví dụ, khoảng từ 0,01 đến 1,0 M Na^+) ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,3, và nhiệt độ ít nhất là 30°C đối với các axit nucleic ngắn (ví dụ, có chiều dài từ 10 đến 50 nucleotit) và ít nhất là 60°C đối với các đoạn dò dài (ví dụ, có chiều dài lớn hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt thấp được nêu làm ví dụ gồm có tạo thể lai bằng dung dịch đệm chứa formamit từ 30 đến 35%, NaCl 1,0 M, natri dodecyl sulfat (SDS) 0,1% ở nhiệt độ 37°C , và rửa trong SSC từ 1X đến 2X (SSC 20X = NaCl 3,0 M/trinatri xitrat 0,3 M) ở nhiệt độ từ 50 đến 55°C . Các điều kiện nghiêm ngặt trung bình được nêu làm ví dụ gồm có tạo thể lai trong formamit từ 40 đến 45%, NaCl 1,0 M, SDS 0,1% ở nhiệt độ 37°C và rửa trong SSC 0,5X đến 1X ở nhiệt độ từ 55 đến 60°C . Các điều kiện nghiêm ngặt cao được nêu làm ví dụ gồm có tạo thể lai trong formamit khoảng 50%, muối Na khoảng 1,0 M, SDS khoảng 0,1% ở nhiệt độ khoảng 37°C , và rửa trong SSC khoảng 0,1X ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 65°C .

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit” bao gồm polypeptit ở dạng số ít, polypeptit ở dạng số nhiều, và các mảnh của chúng. Thuật ngữ này được dùng để chỉ phân tử được cấu thành từ các monome (axit amin) được liên kết một cách tuyến tính bằng các liên kết amit (còn được gọi là các liên kết peptit). Thuật ngữ “polypeptit” được dùng để chỉ chuỗi hoặc các chuỗi bất kỳ của hai hoặc nhiều axit amin, và không chỉ chiều dài hoặc kích thước cụ thể của sản phẩm này. Do đó, các

peptit, dipeptit, tripeptit, oligopeptit, protein, chuỗi axit amin, và thuật ngữ khác bất kỳ được sử dụng để chỉ chuỗi hoặc các chuỗi của hai hoặc nhiều axit amin, được bao gồm trong định nghĩa của “polypeptit,” và các thuật ngữ nêu trên được sử dụng thay thế được cho “polypeptit” trong bản mô tả này. Polypeptit có thể được phân lập từ nguồn sinh học tự nhiên hoặc được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp, nhưng polypeptit cụ thể không nhất thiết phải được dịch mã từ một axit nucleic cụ thể. Polypeptit có thể được tạo ra theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở, bằng cách tổng hợp hóa học.

Nội sinh và khác loại: Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “nguyên thể” được dùng để chỉ dạng của polynucleotit, gen hoặc polypeptit được tìm thấy trong tự nhiên có trình tự điều hòa của chính nó, nếu có. Thuật ngữ “nội sinh” được dùng để chỉ dạng nguyên thể của polynucleotit, gen hoặc polypeptit ở vị trí tự nhiên của nó trong sinh vật hoặc trong hệ gen của sinh vật.

Ngược lại, thuật ngữ “khác loại” được dùng để chỉ polynucleotit, gen hoặc polypeptit không được tìm thấy thông thường ở vị trí của nó trong sinh vật đối chiếu (chủ). Ví dụ, axit nucleic khác loại có thể là axit nucleic được tìm thấy thông thường trong sinh vật đối chiếu ở vị trí hệ gen khác nhau. Ví dụ khác, axit nucleic khác loại có thể là axit nucleic không được tìm thấy thông thường trong sinh vật đối chiếu. Sinh vật chủ chứa polynucleotit, gen hoặc polypeptit khác loại có thể được tạo ra bằng cách đưa polynucleotit, gen hoặc polypeptit khác loại vào sinh vật chủ này. Trong ví dụ cụ thể, polynucleotit khác loại chứa trình tự mã hóa nguyên thể, hoặc một phần của nó, được đưa trở lại sinh vật nguồn ở dạng khác với polynucleotit nguyên thể tương ứng. Trong ví dụ cụ thể, gen khác loại chứa trình tự mã hóa nguyên thể, hoặc một phần của nó, được đưa trở lại sinh vật nguồn ở dạng khác với gen nguyên thể tương ứng. Ví dụ, gen khác loại có thể chứa trình tự mã hóa nguyên thể là một phần của gen khảm chứa vùng điều hòa không nguyên thể được đưa trở lại vào vật chủ nguyên thể. Trong các ví dụ cụ thể, polypeptit khác loại là polypeptit nguyên thể được đưa trở lại vào sinh vật nguồn ở dạng khác với polypeptit nguyên thể tương ứng.

Gen hoặc polypeptit khác loại có thể là gen hoặc polypeptit chứa trình tự polypeptit hoặc axit nucleic chức năng mã hóa polypeptit chức năng được dung hợp với gen hoặc polypeptit khác để tạo ra polypeptit khảm hoặc dung hợp, hoặc gen mã hóa polypeptit này. Các gen và protein theo các phương án cụ thể chứa trình tự có

chiều dài đầy đủ đặc biệt được nêu làm ví dụ và các phần, đoạn, mảnh (kể cả các mảnh liền kề và các mất đoạn bên trong và/hoặc đầu tận cùng so với phân tử có chiều dài đầy đủ), các biến thể, thể đột biến, thể khảm, và thể dung hợp của các trình tự này.

Sự cải biến: Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự cải biến” có thể chỉ sự thay đổi trong polynucleotit tham chiếu, cụ thể dẫn đến giảm, gần như mất, hoặc mất hoạt tính của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit tham chiếu. Sự cải biến cũng có thể chỉ sự thay đổi trong polypeptit tham chiếu, dẫn đến giảm, gần như mất, hoặc mất hoạt tính của polypeptit tham chiếu. Theo cách khác, thuật ngữ “sự cải biến” có thể chỉ sự thay đổi trong polynucleotit tham chiếu, dẫn đến tăng hoặc tăng cường hoạt tính của polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit tham chiếu, cũng như sự thay đổi trong polypeptit tham chiếu dẫn đến tăng hoặc tăng cường hoạt tính của polypeptit tham chiếu. Các thay đổi như nêu trên có thể được tạo ra bằng một số phương pháp bất kì đã biết rõ trong lĩnh vực này bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: làm mất một phần phân tử tham chiếu; gây đột biến phân tử tham chiếu (ví dụ, thông qua gây đột biến tự phát, thông qua gây đột biến ngẫu nhiên, thông qua gây đột biến bởi các gen gây đột biến, và thông qua gây đột biến bằng gen nhẩy); thay thế một phần của phân tử tham chiếu; cài xen phân tử vào phân tử tham chiếu; điều chỉnh giảm sự biểu hiện của phân tử tham chiếu; biến đổi vị trí tế bào của phân tử tham chiếu; biến đổi trạng thái của phân tử tham chiếu (ví dụ, thông qua sự metyl hóa polynucleotit tham chiếu, và thông qua sự phosphoryl hóa hoặc ubiquitin hóa của polypeptit tham chiếu); loại bỏ đồng yếu tố của phân tử tham chiếu; đưa ARN/ADN đối mã hướng đích phân tử tham chiếu; đưa ARN/ADN can thiệp hướng đích phân tử tham chiếu; cải biến hóa học phân tử tham chiếu; cải biến đồng hóa trị phân tử tham chiếu; chiếu xạ phân tử tham chiếu bằng bức xạ UV hoặc tia X; tái tổ hợp tương đồng làm biến đổi phân tử tham chiếu; tái tổ hợp nguyên phân làm biến đổi phân tử tham chiếu; thay thế trình tự khởi động của phân tử tham chiếu; và/hoặc kết hợp của phương pháp bất kì nêu trên.

Hướng dẫn xác định xem nucleotit hoặc gốc axit amin nào có thể được cải biến trong ví dụ cụ thể có thể được tìm ra bằng cách so sánh trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit tham chiếu với trình tự của polynucleotit hoặc polypeptit tương đồng (ví dụ, nấm men hoặc vi khuẩn tương đồng), và tối đa hóa số lượng các cải biến được tạo ra

trong các vùng có độ tương đồng cao (các vùng được bảo toàn) hoặc các trình tự liên ứng.

Dẫn xuất và biến thể: Thuật ngữ “dẫn xuất,” được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ các cải biến của trình tự được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này. Các cải biến này bao gồm thay thế, cài xen, và/hoặc làm mất một hoặc nhiều bazơ của trình tự mã hóa trong bản mô tả này mà duy trì, thay đổi một chút, hoặc tăng chức năng của trình tự mã hóa ở loài cây trồng. Các dẫn xuất như vậy có thể dễ dàng xác định được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ và không giới hạn ở, bằng cách sử dụng các kỹ thuật mô hình hóa bằng máy tính để dự đoán và tối ưu hóa cấu trúc trình tự. Do đó, thuật ngữ “dẫn xuất” còn bao gồm các axit nucleic khác loại chứa trình tự có độ đồng nhất trình tự đáng kể với trình tự được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này, sao cho chúng có thể có chức năng giống, thay đổi một chút, hoặc tăng để sử dụng trong việc biểu hiện DGT-28 ở cây trồng.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “biến thể” được dùng để chỉ polypeptit khác với polypeptit được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này bởi sự cài xen, làm đoạn, đột biến, và/hoặc thay thế axit amin, như có thể được đưa vào bằng cách sử dụng, ví dụ và không giới hạn ở, các kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Hướng dẫn xác định xem các gốc axit amin nào có thể được thay thế, bổ sung, hoặc làm mất trong trình tự axit amin tham chiếu có thể được tìm ra bằng cách so sánh trình tự của polypeptit tham chiếu cụ thể với trình tự của polypeptit tương đồng, và giảm thiểu số lượng các thay đổi trình tự axit amin được tạo ra trong các vùng có độ tương đồng cao (các vùng được bảo toàn), hoặc bằng cách thay thế các axit amin bằng trình tự liên ứng. Polypeptit biến thể có thể có các axit amin được thế, và vẫn giữ được hoạt tính chức năng của polypeptit tham chiếu. Các gen “biến thể” chứa trình tự nucleotit mã hóa cùng một polypeptit làm gen tham chiếu hoặc polypeptit tương đương có hoạt tính tương đương hoặc tương tự như polypeptit tham chiếu.

Theo một số phương án, các gen biến thể có thể được sử dụng để tạo ra các protein biến thể, và vật chủ tái tổ hợp có thể được sử dụng để tạo ra các protein biến thể. Ví dụ, các gen và các protein biến thể có thể được tạo ra chứa các gốc liền kề (axit amin hoặc nucleotit) của trình tự bất kì được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này. Gen hoặc protein biến thể có thể có, ví dụ và không giới hạn ở: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, và 293 gốc liền kề (axit amin hoặc nucleotit) tương ứng với đoạn (có cùng kích thước) trong trình tự được nêu làm ví dụ. Các đoạn có kích thước tương tự, đặc biệt là các đoạn của các vùng được bảo toàn, cũng có thể được sử dụng làm đoạn dò và/hoặc đoạn mồi.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu bằng nhiều mức độ đồng nhất trình tự có thể hữu ích trong việc nhận diện các polypeptit (ví dụ, từ loài khác) có chức năng hoặc hoạt tính giống hoặc tương tự làm polypeptit tham chiếu. Theo một số phương án, polypeptit biến thể có độ đồng nhất trình tự (khi so sánh với polypeptit tham chiếu; ví dụ, polypeptit DGT-28) là, ví dụ và không giới hạn ở: ít nhất khoảng 55%; ít nhất khoảng 60%; ít nhất khoảng 65%; ít nhất khoảng 70%; ít nhất khoảng 75%; ít nhất khoảng 80%; ít nhất khoảng 85%; ít nhất khoảng 90%; và ít nhất khoảng 95%, có chức năng giống hoặc tương tự như polypeptit tham chiếu.

Các biện pháp để thiết kế và tạo ra các gen và các protein biến thể chứa các gốc liền kề của phân tử cụ thể có thể được xác định bằng cách thu thập và kiểm tra cấu trúc của protein quan tâm (ví dụ, phối trí nguyên tử 3-D (ba chiều) từ cấu trúc tinh thể và/hoặc mô hình phân tử). Trong một số ví dụ, biện pháp này có thể định hướng đến một số đoạn của protein là lý tưởng để cải biến, như các đoạn tiếp xúc bề mặt, và các đoạn không ở bên trong có liên quan với việc gấp nếp protein và trạng thái nguyên vẹn

cấu trúc 3-D cần thiết. US 5,605,793 chẳng hạn đề cập đến các phương pháp tạo ra tính đa dạng phân tử bổ sung bằng cách ghép lại ADN sau khi phân mảnh ngẫu nhiên hoặc tập trung. Gen này có thể được gọi là gen “xáo trộn,” thường bao gồm các mảnh trộn (có kích thước mong muốn) của hai hoặc nhiều phân tử ADN khác nhau, tiếp theo là các chu kỳ phục hồi trạng thái nguyên thể lặp lại. Quá trình này có thể cải thiện hoạt tính của protein được mã hóa bởi gen đang xét. Kết quả có thể là protein khám có hoạt tính cải thiện, tính đặc hiệu cơ chất thay đổi, tính ổn định enzym tăng, tính bố trí có định trong không gian thay đổi, hoặc các đặc tính khác.

"Sự thay thế" axit amin có thể là kết quả của việc thay thế một axit amin trong trình tự tham chiếu bằng một axit amin khác có đặc tính cấu trúc và/hoặc hóa học tương tự (tức là sự thay thế axit amin bảo toàn), hoặc có thể là kết quả của việc thay thế một axit amin trong trình tự tham chiếu bằng axit amin có đặc tính cấu trúc và/hoặc hóa học khác (tức là sự thay thế axit amin không bảo toàn). Các axit amin có thể được phân vào các nhóm cấu trúc và/hoặc hóa học sau: không phân cực; phân cực không tích điện; bazơ; và axit. Do đó, sự thay thế axit amin “bảo toàn” có thể được thực hiện trên cơ sở sự tương tự về tính phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc có liên quan. Ví dụ, các axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm glyxin, alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, và metionin; các axit amin phân cực không tích điện (trung tính) bao gồm serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; các axit amin tích điện dương (bazơ) bao gồm arginin, lysin, và histidin; và các axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Theo cách khác, sự thay thế axit amin “không bảo toàn” có thể được thực hiện bằng cách lựa chọn các khác biệt về độ phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, hoặc bản chất lưỡng tính của axit amin bất kỳ trong các axit amin này. “Sự cài xen” hoặc “sự làm mất” có thể nằm trong phạm vi biến đổi cho phép về cấu trúc hoặc chức năng bởi các protein tái tổ hợp.

Theo một số phương án, protein biến thể “bị cắt ngắn” so với protein tham chiếu có chiều dài đầy đủ. Trong một số ví dụ, protein bị cắt ngắn giữ được hoạt tính chức năng của protein tham chiếu. Protein “bị cắt ngắn”, có nghĩa là một phần của protein có thể được phân cắt, chẳng hạn, trong khi protein bị cắt ngắn còn lại vẫn giữ được và biểu hiện hoạt tính mong muốn sau khi phân cắt. Việc phân cắt có thể đạt được bằng các proteaza khác nhau bất kỳ. Ngoài ra, các protein được phân cắt hiệu quả có thể

được tạo ra bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, trong đó các bazơ của ADN mã hóa một phần protein được loại khỏi trình tự mã hóa, qua việc phân cắt bằng endonucleaza giới hạn hoặc các kỹ thuật khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực thực hiện được. Protein bị cắt ngắn có thể được biểu hiện trong hệ khác loại, ví dụ, *E. coli*, baculovirut, hệ virut trên cơ sở thực vật, và nấm men. Các protein bị cắt ngắn truyền tính chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được xác nhận bằng cách sử dụng hệ khác loại biểu hiện protein trong thử nghiệm sinh học về tính chống chịu thuốc diệt cỏ, như được mô tả trong bản mô tả này. Đã biết rõ trong lĩnh vực này rằng các protein bị cắt ngắn có thể được tạo ra thành công sao cho chúng vẫn giữ được hoạt tính chức năng của protein tham chiếu có chiều dài đầy đủ. Ví dụ, các protein Bt có thể được sử dụng ở dạng bị cắt ngắn (protein lõi) dạng. Xem, ví dụ., Hofte and Whiteley (1989) Microbiol. Rev. 53(2):242-55; và Adang et al. (1985) Gene 36:289-300.

Trong một số trường hợp, đặc biệt đối với việc biểu hiện ở thực vật, có thể có lợi khi sử dụng các gen bị cắt ngắn biểu hiện các protein bị cắt ngắn. Các gen bị cắt ngắn có thể mã hóa polypeptit chiếm, ví dụ, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, hoặc 99% protein có chiều dài đầy đủ.

Các gen và các protein biến thể giữ được chức năng của trình tự tham chiếu mà từ đó chúng được thiết kế có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách thử nghiệm hoạt tính của các biến thể tái tổ hợp. Nếu thử nghiệm hoạt tính này là đã biết và được mô tả, thì việc xác định các biến thể chức năng chỉ cần thử nghiệm thường quy.

Các thay đổi cụ thể về “vị trí hoạt động” của enzym có thể được thực hiện để ảnh hưởng đến chức năng vốn có của nó về hoạt tính hoặc tính bố trí cố định trong không gian. Xem Muller et al. (2006) Protein Sci. 15(6):1356-68. Ví dụ, cấu trúc tauD đã biết được sử dụng làm mô hình dioxygenaza để xác định các gốc vị trí hoạt động khi gắn kết với cơ chất vốn có của nó, taurin. Xem Elkins et al. (2002) Biochemistry 41(16):5185-92. Các thông tin khác về khả năng thiết kế và sự tối ưu hóa trình tự của các vị trí hoạt động của enzym có thể được tìm thấy trong Chakrabarti et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(34):12035-40.

Các đặc tính cấu trúc khác nhau và đặc điểm ba chiều của protein có thể được thay đổi mà không ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính/chức năng của protein này. Sự thay thế axit amin bảo toàn có thể được thực hiện mà không ảnh hưởng bất lợi đến hoạt tính và/hoặc cấu trúc ba chiều của phân tử (sự thay thế “cho phép”). Các protein biến thể cũng có thể được thiết kế khác nhau ở mức trình tự so với protein tham chiếu, nhưng vẫn giữ được toàn bộ cấu trúc ba chiều cần thiết, sự phân bố điện tích bề mặt, và các đặc tính tương tự giống hoặc tương đương. Xem, ví dụ, US 7,058,515; Larson et al. (2002) *Protein Sci.* 11:2804-13; Cramer et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:436-8; Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-51; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-91; Stemmer (1995) *Bio/Technology* 13:549-53; Cramer et al. (1996) *Nat. Med.* 2:100-3; và Cramer et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14: 315-9.

Thiết kế bằng máy tính các UTR (untranslated region - vùng không được dịch mã) 5' hoặc 3' (ví dụ, các kẹp tóc tổng hợp) thích hợp để sử dụng trong cấu trúc biểu hiện (ví dụ, cấu trúc biểu hiện DGT-28) cũng có thể được thực hiện, và có thể được sử dụng để thiết kế các phần tử trong các axit nucleic theo một số phương án trong bản mô tả này. Mô hình hóa bằng máy tính và các UTR và các kỹ thuật mô hình hóa bằng máy tính để sử dụng trong việc dự đoán/đánh giá các dẫn xuất UTR 5' và 3' bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: MFold™ phiên bản 3.1 (có thể mua được từ Genetics Corporation Group, Madison, WI; xem Zucker et al. “Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide,” in *RNA Biochemistry and Biotechnology*, 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 1999; Zucker et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 288:911-40; Zucker et al. “RNA Secondary Structure Prediction,” in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, S. Beaucage, D.E. Bergstrom, G.D. Glick, and R.A. Jones eds., John Wiley & Sons, New York, 11.2.1-11.2.10, 2000); và COVE™ (phân tích cấu trúc ARN bằng các mô hình hiệp phương sai (phương pháp văn phạm phi ngữ cảnh ngẫu nhiên)) v.2.4.2 (Eddy and Durbin (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:2079-88), được phân phối tự do dưới dạng mã nguồn và có thể được tải xuống bằng cách truy cập trang web, genetics.wustl.edu/eddy/software/; và FOLDALIGN™ (xem Gorodkin et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(18):3724-32 and Gorodkin et al. (1997) *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ISMB International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*

5:120-123), cũng được phân phối tự do và sẵn để tải xuống ở trang web, foldalign.ku.dk/software/index.html.

Trình tự khởi động: Thuật ngữ “trình tự khởi động” được dùng để chỉ trình tự ADN có khả năng kiểm soát sự biểu hiện của trình tự mã hóa axit nucleic hoặc ARN chức năng. Trong các ví dụ, trình tự mã hóa được kiểm soát nằm ở vị trí 3' so với trình tự khởi động. Trình tự khởi động có thể có nguồn gốc toàn bộ từ gen nguyên thể, trình tự khởi động có thể bao gồm các phần tử khác nhau có nguồn gốc từ các trình tự khởi động khác nhau được tìm thấy trong tự nhiên, hoặc trình tự khởi động thậm chí có thể bao gồm các đoạn ADN tổng hợp. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các trình tự khởi động khác nhau có thể biểu hiện trực tiếp gen trong các mô hoặc loại tế bào khác nhau, hoặc ở các giai đoạn phát triển khác nhau, hoặc đáp lại các điều kiện môi trường hoặc sinh lý khác nhau. Ví dụ về tất cả các trình tự khởi động nêu trên là đã biết và được sử dụng trong lĩnh vực này để kiểm soát sự biểu hiện của các axit nucleic khác loại. Các trình tự khởi động trực tiếp biểu hiện gen trong hầu hết các loại tế bào ở hầu hết các thời điểm thường được gọi là “các trình tự khởi động cơ bản”. Ngoài ra, trong khi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực đã (trong nhiều trường hợp không thành công) nỗ lực vạch ra các ranh giới chính xác của các trình tự điều hòa, cần hiểu rằng các đoạn ADN có chiều dài khác nhau có thể có hoạt tính trình tự khởi động giống nhau. Hoạt tính trình tự khởi động của axit nucleic cụ thể có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các kỹ thuật quen thuộc với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Liên kết có điều khiển: Thuật ngữ “liên kết có điều khiển” được dùng để chỉ liên kết của các trình tự axit nucleic trên cùng một axit nucleic, trong đó chức năng của một trong các trình tự axit nucleic bị ảnh hưởng bởi trình tự khác. Ví dụ, trình tự khởi động được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa khi trình tự khởi động này có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa đó (ví dụ, trình tự mã hóa nằm dưới sự kiểm soát phiên mã của trình tự khởi động). Trình tự mã hóa có thể được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa theo hướng xuôi hoặc ngược chiều phiên mã.

Sự biểu hiện: Thuật ngữ “sự biểu hiện,” được sử dụng trong bản mô tả này, có thể được dùng để chỉ sự phiên mã và tích lũy ổn định ARN mã hóa (mARN) hoặc ARN đối mã có nguồn gốc từ ADN. Sự biểu hiện cũng có thể chỉ sự dịch mã mARN thành polypeptit. Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự biểu hiện quá

mức” được dùng để chỉ mức biểu hiện cao hơn so với mức biểu hiện nội sinh của cùng một gen hoặc gen liên quan. Do đó, gen khác loại “được biểu hiện quá mức” nếu mức biểu hiện của nó cao hơn so với mức biểu hiện của gen nội sinh tương tự.

Sự biến nạp: Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “sự biến nạp” được dùng để chỉ việc chuyển và kết hợp axit nucleic hoặc mảnh của nó vào trong sinh vật chủ, dẫn đến sự kế thừa ổn định về mặt di truyền. Các sinh vật chủ chứa axit nucleic biến nạp được gọi là sinh vật “chuyển gen,” “tái tổ hợp,” hoặc “được biến nạp”. Các phương pháp biến nạp đã biết bao gồm, ví dụ: Biến nạp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *A. rhizogenes*; biến nạp canxi phosphat; biến nạp polybrene; dung hợp thể nguyên sinh; điện di; các phương pháp siêu âm (ví dụ, sự tạo lỗ màng bằng sóng âm); biến nạp liposom; vi tiêm; biến nạp bằng ADN trần; biến nạp bằng các vector plasmit; biến nạp bằng các vector virus; biến nạp bằng bắn gen (bắn vi hạt); biến nạp qua trung gian silic cacbua WHISKERS; phát chùm sol khí (aerosol beaming); và biến nạp qua trung gian PEG.

Được đưa vào: Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được đưa vào” (trong trường hợp đưa axit nucleic vào tế bào) bao gồm sự biến nạp tế bào, cũng như lai giống thực vật chứa axit nucleic với thực vật thứ hai, sao cho thực vật thứ hai chứa axit nucleic, như có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật gây giống thực vật thông thường. Các kỹ thuật gây giống như vậy là đã biết trong lĩnh vực này. Về bản luận các kỹ thuật gây giống thực vật, xem Poehlman (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Edition, AVI Publication Co., Westport CT.

Các phương pháp lai ngược có thể được sử dụng để đưa axit nucleic vào thực vật. Kỹ thuật này đã được sử dụng trong hàng thập kỷ để đưa các tính trạng vào thực vật. Ví dụ mô tả việc lai ngược (và các phương pháp gây giống thực vật khác) có thể được tìm thấy trong, ví dụ, Poelman (1995), nêu trên; và Jensen (1988) *Plant Breeding Methodology*, Wiley, New York, NY. Trong quy trình lai ngược được nêu làm ví dụ, thực vật quan tâm ban đầu (“bố mẹ tái tục”) được lai với thực vật thứ hai (“bố mẹ không tái tục”) mang axit nucleic được đưa vào. Con cháu thu được từ việc lai này sau đó được lai lần nữa với bố mẹ tái tục, và quy trình này được lặp lại cho đến khi thu được thực vật được biến đổi, trong đó gần như tất cả các đặc điểm hình thái và sinh lý học mong muốn của bố mẹ tái tục được thu lại ở thực vật được biến đổi, ngoài axit nucleic từ bố mẹ không tái tục.

Plasmit/vector: Các thuật ngữ “plasmit” và “vector,” được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ phân tử nhiễm sắc thể đặc biệt có thể mang một hoặc nhiều gen không phải là một phần của chuyển hóa trung tâm của tế bào. Các plasmit và vector thường là các phân tử ADN sợi kép vòng. Tuy nhiên, các plasmit và vector có thể là axit nucleic mạch thẳng hoặc vòng, của ADN hoặc ARN sợi đơn hoặc sợi kép, và có thể có nguồn gốc từ nguồn bất kì, trong đó một số trình tự nucleotit đã được xen hoặc tái kết hợp vào cấu trúc duy nhất có khả năng đưa mảnh trình tự khởi động và trình tự ADN mã hóa cùng với trình tự chưa dịch mã 3' thích hợp bất kì vào trong tế bào. Trong các ví dụ, các plasmit và vector có thể bao gồm các trình tự sao chép tự chủ, các trình tự hợp nhất hệ gen, và/hoặc các trình tự thể thực khuẩn hoặc nucleotit.

III. DGT-28 và các trình tự mã hóa DGT-28

Theo một số phương án trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất polypeptit phân lập có độ đồng nhất ít nhất khoảng 90% (ví dụ, độ đồng nhất bằng 89%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, và ít nhất là 99%) so với SEQ ID NO:1. Trong bản mô tả này, polypeptit như vậy được gọi là polypeptit DGT-28. Theo một số phương án trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1. Trong bản mô tả này, ví dụ cụ thể về axit nucleic như vậy được gọi là axit nucleic “*dgt-28*”. Các axit nucleic *dgt-28* có thể hữu ích trong ứng dụng bất kì trong số nhiều ứng dụng khác nhau (ví dụ, đưa lại tính kháng glyphosat) trong đó việc chuyển hóa glyphosat cải biến được mong muốn trong tế bào thực vật.

Ví dụ cụ thể về các axit nucleic *dgt-28* được đưa ra nhằm mục đích minh họa trong bản mô tả này là các SEQ ID NO:2 và 3. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic chứa trình tự nucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 80% (ví dụ, độ đồng nhất bằng 79%, ít nhất là 80%, ít nhất là 81%, ít nhất là 82%, ít nhất là 83%, ít nhất là 84%, ít nhất là 85%, ít nhất là 86%, ít nhất là 87%, ít nhất là 88%, ít nhất là 89%, ít nhất là 90%, ít nhất là 91%, ít nhất là 92%, ít nhất là 93%, ít nhất là 94%, ít nhất là 95%, ít nhất là 96%, ít nhất là 97%, ít nhất là 98%, và ít nhất là 99%) so với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3, trong đó axit nucleic này mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất khoảng 90% so với SEQ ID NO:1. Ví dụ cụ thể về các axit nucleic *dgt-28* bao gồm các axit nucleic lai đặc hiệu với axit nucleic có SEQ

ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong điều kiện nghiêm ngặt (ví dụ, điều kiện nghiêm ngặt cao).

Theo một số phương án, các axit nucleic *dgt-28* được tối ưu hóa về codon được đề xuất. Ví dụ, để thu được mức độ biểu hiện cao của gen khác loại ở thực vật, có thể mong muốn thiết kế và tái xử lý kỹ thuật gen sao cho nó được biểu hiện một cách hiệu quả hơn trong tế bào của thực vật. Phương án này có thể đặc biệt mong muốn trong trường hợp trong đó gen của vi khuẩn được mong muốn biểu diễn trong tế bào thực vật.

Do đó, một số ví dụ trong bản mô tả này đề xuất gen được tối ưu hóa ở thực vật mã hóa protein DGT-28, và phương pháp thiết kế nó, để tạo ra trình tự ADN có thể được biểu hiện một cách tối ưu trong thực vật hai lá mầm hoặc một lá mầm, và trong đó việc cải biến trình tự không cản trở sự dịch mã hoặc sự phiên mã. Việc thiết kế gen *dgt-28* được tối ưu hóa để biểu hiện cùng protein DGT-28 trong cả thực vật một lá mầm và hai lá mầm được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này bằng cách tái xử lý kỹ thuật vùng mã hoá protein của gen này để biểu hiện tối ưu. Các axit nucleic *dgt-28* được tối ưu bởi thực vật được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này bao gồm SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:3.

Trong xử lý kỹ thuật gen mã hóa protein DGT-28 để biểu hiện ở thực vật hai lá mầm hoặc một lá mầm (ví dụ, cây bông, cây canola, cây thuốc lá, cây ngô, cây đậu tương, cây lúa mì và cây lúa), xu hướng sử dụng codon của (các) thực vật chủ về sau có thể được xác định, ví dụ, qua việc sử dụng những cơ sở dữ liệu về trình tự ADN được công bố công khai để tìm kiếm thông tin về sự phân bố codon của các hệ gen thực vật hoặc các vùng mã hoá protein của các gen thực vật khác nhau.

Trong thiết kế các vùng mã hoá trong axit nucleic để biểu hiện ở thực vật, các codon chủ yếu (“lựa chọn thứ nhất”) được ưu tiên bởi thực vật cần được xác định, cũng có thể là lựa chọn thứ hai, thứ ba, thứ tư, v.v. trong số các codon được ưu tiên khi có nhiều lựa chọn. Sau đó, trình tự ADN mới có thể được thiết kế mã hoá trình tự axit amin của cùng peptit (ví dụ, protein DGT-28), nhưng trình tự ADN mới khác với trình tự ADN ban đầu bởi sự thay thế các codon của thực vật (được ưu tiên thứ nhất, được ưu tiên thứ hai, được ưu tiên thứ ba, hoặc được ưu tiên thứ tư, v.v.) để chỉ rõ axit amin ở mỗi vị trí trong trình tự axit amin.

Sau đó, trình tự mới có thể được phân tích các vị trí enzyme giới hạn có thể được tạo ra bằng cách cải biến. Các vị trí được nhận diện có thể được cải biến tiếp bằng cách thay thế các codon này bằng các codon được ưu tiên lựa chọn thứ nhất, thứ hai, thứ ba, hoặc thứ tư. Các vị trí khác trong trình tự có thể ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của gen cần quan tâm là cấu trúc vòng thân, mỗi nối exon:intron (5' hoặc 3'), tín hiệu bổ sung poly A, và tín hiệu kết thúc ARN polymeraza; các vị trí này có thể được loại bỏ bằng cách thay thế các codon của thực vật. Trình tự này có thể được phân tích và cải biến tiếp để giảm tần suất các bộ đôi TA hoặc CG. Ngoài các bộ đôi này, các khối trình tự G hoặc C có nhiều hơn sáu gốc giống nhau có thể ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của trình tự này. Do đó, các khối này có thể được cải biến bằng cách thay thế các codon của lựa chọn thứ nhất hoặc thứ hai, v.v. bằng codon của lựa chọn được ưu tiên tiếp theo.

SEQ ID NO: 2 (*dgt-28* (v5)) được tối ưu hóa để biểu hiện ở thực vật hai lá mầm. SEQ ID NO: 3 (*dgt-28* (v6)) được tối ưu hóa để biểu hiện ở thực vật một lá mầm. Việc sử dụng codon trong các trình tự tổng hợp này được lựa chọn dựa trên việc sử dụng codon được ưu tiên; tức là các sản phẩm biểu hiện của mỗi trình tự được mã hóa bởi các codon có xu hướng sử dụng thực vật một lá mầm hoặc hai lá mầm, và các trình tự có hại và các vị trí cắt giới hạn thừa được loại bỏ để làm tăng hiệu quả của việc phiên mã/dịch mã của polypeptit DGT-28 và để tạo thuận lợi cho các bước thao tác ADN.

Tương tự như vậy, phân tử axit nucleic của SEQ ID NO: 4 (*dgt-28* (v1)) được tối ưu hóa để cải thiện sự biểu hiện ở *Escherichia coli*. Việc sử dụng codon trong SEQ ID NO:4 được lựa chọn dựa trên việc sử dụng codon *E.coli* được ưu tiên; protein biểu hiện được mã hóa bởi các codon có xu hướng sử dụng *E.coli*. Trong khi thiết kế lại, các trình tự có hại và các vị trí cắt giới hạn thừa được loại bỏ để làm tăng hiệu quả của việc phiên mã/dịch mã của trình tự mã hóa DGT-28 và để tạo thuận lợi cho bước thao tác ADN. Do đó, sự biểu hiện DGT-28 từ axit nucleic chứa SEQ ID NO:4 ở *E. coli* có thể dẫn đến sự biểu hiện mạnh protein, ví dụ, đối với việc mô tả đặc điểm enzyme của DGT-28.

Khi trình tự ADN được tối ưu hóa (ví dụ, được tối ưu hóa ở thực vật) được thiết kế trên lý thuyết, hoặc *in silico*, các phân tử ADN thực tế có thể được tổng hợp trong phòng thí nghiệm để tương ứng một cách chính xác về trình tự với trình tự được thiết kế. Các phân tử axit nucleic tổng hợp này có thể được tách dòng và nếu không được

thao tác một cách chính xác như thể chúng có nguồn gốc từ các nguồn tự nhiên hoặc nguyên thể.

Axit nucleic trong bản mô tả này có thể được tách dòng vào vector để biến nạp trong các tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình để sao chép và/hoặc biểu hiện. Các vector có thể là vector sinh vật chưa có nhân điển hình; ví dụ, plasmit, hoặc vector con thoi, vector côn trùng, hoặc vector sinh vật có nhân điển hình. Axit nucleic trong bản mô tả này cũng có thể được tách dòng vào vector biểu hiện, ví dụ, để dùng cho tế bào thực vật. Trong một số ứng dụng, có thể thích có các vector có chức năng trong *E. coli* (ví dụ, sản xuất protein để làm tăng kháng thể, phân tích trình tự ADN, cấu trúc của các đoạn xen, thu các lượng axit nucleic).

Để biểu hiện protein DGT-28 trong tế bào, axit nucleic mã hóa protein thường được tách dòng phụ vào vector biểu hiện chứa trình tự khởi động để phiên mã trực tiếp. Các trình tự khởi động của vi khuẩn và sinh vật có nhân điển hình thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, trong Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989; 3rd ed., 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); và *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel và các đồng tác giả, nêu trên). Các hệ biểu hiện của vi khuẩn để biểu hiện axit nucleic trong bản mô tả này là có sẵn trong, ví dụ, *E. coli*, *Bacillus sp.*, và *Salmonella* (Palva et al., *Gene* 22:229-235 (1983)). Các bộ kit cho các hệ biểu hiện này là có trên thị trường. Các hệ biểu hiện của sinh vật có nhân điển hình đối với tế bào động vật có vú, nấm men, và tế bào côn trùng là đã biết rõ bởi các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và cũng có sẵn trên thị trường.

Vector biểu hiện cụ thể được sử dụng để vận chuyển thông tin di truyền vào tế bào được chọn liên quan đến mục đích sử dụng dự định của protein DGT-28 (ví dụ, sự biểu hiện trong các thực vật, động vật, vi khuẩn, nấm, và động vật nguyên sinh). Các vector biểu hiện của vi khuẩn và động vật tiêu chuẩn là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả chi tiết trong, ví dụ, công bố patent 20050064474A1 và công bố patent quốc tế WO 05/084190, WO05/014791 và WO03/080809. Các phương pháp chuyển nhiễm chuẩn có thể được sử dụng để tạo ra dòng tế bào vi khuẩn biểu hiện các lượng lớn protein, protein này sau đó có thể được tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn.

Việc lựa chọn trình tự khởi động được sử dụng để biểu hiện trực tiếp axit nucleic trong bản mô tả này phụ thuộc vào ứng dụng cụ thể. Một số trình tự khởi động biểu hiện trực tiếp gen trong thực vật có thể được dùng theo các phương án trong bản mô tả này. Các trình tự khởi động này có thể được chọn từ các trình tự khởi động cơ bản, được điều chỉnh về mặt hoá học, cảm ứng, đặc hiệu mô, và được ưu tiên bởi hạt. Ví dụ, trình tự khởi động cơ bản mạnh phù hợp với tế bào vật chủ có thể được sử dụng để biểu hiện và tinh chế các protein DGT-28. Các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các trình tự khởi động thực vật bao gồm các trình tự khởi động có nguồn gốc từ *A. thaliana* ubiquitin-10 (ubi-10) (Callis, et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265:12486-12493); *A. tumefaciens* mannopin syntaza (Δ mas) (Petolino và các đồng tác giả, US 6,730,824); và/hoặc virus gây bệnh khảm gân trên sắn (CsVMV) (Verdaguer et al., 1996, *Plant Molecular Biology* 31:1129-1139).

Các trình tự khởi động cơ bản bao gồm, ví dụ, trình tự khởi động 35S của nhân virus gây bệnh khảm súp lơ (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812); Rice Actin promoter (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2:163-171); trình tự khởi động Ubiquitin trên cây ngô (US 5,510,474; Christensen et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 và Christensen et al. (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); trình tự khởi động pEMU (Last et al. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); trình tự khởi động ALS (US 5,659,026); trình tự khởi động histon trên cây ngô (Chabouté et al. *Plant Molecular Biology*, 8:179-191 (1987)); và các gen tương tự.

Phạm vi của các trình tự khởi động tương hợp thực vật hiện có bao gồm các trình tự khởi động cảm ứng và đặc hiệu mô. Yếu tố điều hòa cảm ứng là yếu tố có khả năng hoạt hóa trực tiếp hoặc gián tiếp sự phiên mã của một hoặc nhiều trình tự ADN hoặc gen đáp ứng với chất cảm ứng. Khi không có chất cảm ứng thì trình tự ADN hoặc gen sẽ không được phiên mã. Thông thường, yếu tố protein gắn kết đặc hiệu với yếu tố điều hòa cảm ứng để hoạt hóa sự phiên mã có mặt ở dạng bất hoạt, sau đó được chuyển hóa trực tiếp hoặc gián tiếp thành dạng hoạt tính bởi chất cảm ứng. Chất cảm ứng có thể là chất hóa học như protein, chất chuyển hóa, chất điều hòa tăng trưởng, thuốc diệt cỏ hoặc hợp chất phenol hoặc điều kiện bất lợi sinh lý được tác động trực tiếp bởi nhiệt, lạnh, muối, hoặc các yếu tố gây độc hoặc gián tiếp qua hoạt động của mầm bệnh hoặc tác nhân gây bệnh như virus. Thông thường, yếu tố protein gắn kết đặc hiệu với yếu tố điều hòa cảm ứng để hoạt hóa sự phiên mã có mặt ở dạng bất hoạt, sau

đó được chuyển hóa trực tiếp hoặc gián tiếp thành dạng hoạt tính bởi chất cảm ứng. Tế bào thực vật chứa yếu tố điều hòa cảm ứng có thể được cho tiếp xúc với chất cảm ứng bằng cách đưa chất cảm ứng từ bên ngoài vào tế bào hoặc thực vật như bằng cách phun, tưới, gia nhiệt hoặc các phương pháp tương tự.

Trình tự khởi động cảm ứng bất kì có thể được sử dụng theo các phương án trong bản mô tả này. Xem Ward et al. *Plant Mol. Biol.* 22: 361-366 (1993). Các trình tự khởi động cảm ứng bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: trình tự khởi động thụ thể ecdyson (US 6,504,082); các trình tự khởi động từ hệ ACE1 (angiotensin-converting enzyme 1 - enzym chuyển hóa angiotensin) đáp ứng với đồng (Mett et al. *PNAS* 90: 4567-4571 (1993)); gen In2-1 và In2-2 từ cây ngô đáp ứng với thuốc diệt cỏ an toàn benzensulfonamid (US 5,364,780; Hershey et al., *Mol. Gen. Genetics* 227: 229-237 (1991) và Gatz et al., *Mol. Gen. Genetics* 243: 32-38 (1994)); gen kim hãm Tet từ Tn10 (Gatz et al., *Mol. Gen. Genet.* 227: 229-237 (1991); các trình tự khởi động từ gen hormon steroid, hoạt động phiên mã của chúng được cảm ứng bởi hormon glucocorticosteroid, Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10421 (1991) và McNellis et al., (1998) *Plant J.* 14(2):247-257; trình tự khởi động GST trên cây ngô, được hoạt hóa bởi các hợp chất ái điện tử kỵ nước được sử dụng làm thuốc diệt cỏ trước khi cây mọc (xem US 5,965,387 và công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 93/001294); và trình tự khởi động PR-1a trên cây thuốc lá, được hoạt hóa bởi axit salixylic (xem Ono S, Kusama M, Ogura R, Hiratsuka K., "Evaluation of the Use of the Tobacco PR-1a Promoter to Monitor Defense Gene Expression by the Luciferase Bioluminescence Reporter System," *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011 Sep 23;75(9):1796-800). Các trình tự khởi động cần quan tâm được điều hòa bởi chất hóa học khác bao gồm các trình tự khởi động cảm ứng bởi tetracycline và kim hãm bởi tetracycline (xem, ví dụ, Gatz et al., (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, và US 5,814,618 và US 5,789,156).

Các trình tự khởi động cần quan tâm có thể điều hòa được khác bao gồm yếu tố điều hòa đáp ứng với lạnh hoặc yếu tố điều hòa sốc nhiệt, mà sự phiên mã của chúng có thể được thực hiện khi đáp ứng với việc tiếp xúc tương ứng với lạnh hoặc nhiệt (Takahashi et al., *Plant Physiol.* 99:383-390, 1992); trình tự khởi động của gen dehydrogenaza rượu (Gerlach et al., *PNAS USA* 79:2981-2985 (1982); Walker et al., *PNAS* 84(19):6624-6628 (1987)), trình tự khởi động cảm ứng bởi các điều kiện kỵ khí;

trình tự khởi động cảm ứng bởi ánh sáng có nguồn gốc từ gen pea rbcS hoặc gen pea psaDb (Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12(2):255-265); yếu tố điều hòa cảm ứng bởi ánh sáng (Feinbaum et al., *Mol. Gen. Genet.* 226:449, 1991; Lam and Chua, *Science* 248:471, 1990; Matsuoka et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20):9586-9590; Orozco et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 23(6):1129-1138); yếu tố điều hòa cảm ứng bởi hormon thực vật (Yamaguchi-Shinozaki et al., *Plant Mol. Biol.* 15:905, 1990; Kares et al., *Plant Mol. Biol.* 15:225, 1990), và các loại tương tự. Yếu tố điều hòa cảm ứng cũng có thể là trình tự khởi động của gen In2-1 hoặc In2-2 trên cây ngô, đáp ứng với thuốc diệt cỏ an toàn benzensulfonamid (Hershey et al., *Mol. Gen. Gene.* 227:229-237, 1991; Gatz et al., *Mol. Gen. Genet.* 243:32-38, 1994), và gen kìm hãm Tet của gen nhảy Tn10 (Gatz et al., *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237, 1991).

Các trình tự khởi động cảm ứng bởi điều kiện bất lợi bao gồm trình tự khởi động cảm ứng bởi điều kiện bất lợi về muối/nước như P5CS (Zang et al. (1997) *Plant Sciences* 129:81-89); trình tự khởi động cảm ứng bởi lạnh, như cor15a (Hajela et al. (1990) *Plant Physiol.* 93:1246-1252), cor15b (Wilhelm et al. (1993) *Plant Mol Biol* 23:1073-1077), wsc120 (Ouellet et al. (1998) *FEBS Lett.* 423-324-328), ci7 (Kirch et al. (1997) *Plant Mol Biol.* 33:897-909), và ci21A (Schneider et al. (1997) *Plant Physiol.* 113:335-45); trình tự khởi động cảm ứng bởi hạn hán, như Trg-31 (Chaudhary et al (1996) *Plant Mol. Biol.* 30:1247-57) và rd29 (Kasuga et al. (1999) *Nature Biotechnology* 18:287-291); trình tự khởi động cảm ứng bởi thâm thấu, như Rab17 (Vilardell et al. (1991) *Plant Mol. Biol.* 17:985-93) và osmotin (Raghothama et al. (1993) *Plant Mol Biol* 23:1117-28); trình tự khởi động cảm ứng bởi nhiệt, như các protein sốc nhiệt (Barros et al. (1992) *Plant Mol.* 19:665-75; Marrs et al. (1993) *Dev. Genet.* 14:27-41), smHSP (Waters et al. (1996) *J. Experimental Botany* 47:325-338); và yếu tố cảm ứng bởi sốc nhiệt từ trình tự khởi động ubiquitin trên cây mùi tây (WO 03/102198). Các trình tự khởi động cảm ứng bởi điều kiện bất lợi khác bao gồm rip2 (US 5,332,808 và US 2003/0217393) và rd29a (Yamaguchi-Shinozaki et al. (1993) *Mol. Gen. Genetics* 236:331-340). Một số trình tự khởi động có thể được cảm ứng bởi vết thương, bao gồm trình tự khởi động pMAS *Agrobacterium* (Guevara-Garcia et al. (1993) *Plant J.* 4(3):495-505) và trình tự khởi động ORF13 *Agrobacterium* (Hansen et al., (1997) *Mol. Gen. Genet.* 254(3):337-343).

Trình tự khởi động được ưu tiên mô có thể được dùng nhằm mục đích tăng cường sự phiên mã và/hoặc biểu hiện trong mô thực vật cụ thể. Ví dụ về các loại trình tự khởi động này bao gồm sự biểu hiện được ưu tiên hạt, như sự biểu hiện được tạo ra bởi trình tự khởi động phaseolin (Bustos et al. 1989. *The Plant Cell* Vol. 1, 839-853), và gen globulin-1 trên cây ngô, Belanger, et al. 1991 *Genetics* 129:863-972. Đối với các cây hai lá mầm, trình tự khởi động được ưu tiên hạt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, β -phaseolin đậu, napin, β -conglyxinin, lectin đậu tương, cruciferin, và các loại tương tự. Đối với cây một lá mầm, trình tự khởi động được ưu tiên hạt bao gồm, nhưng không giới hạn ở, zein 15 kDa, zein 22 kDa, zein 27 kDa, γ -zein, waxy, shrunken 1, shrunken 2, globulin 1, v.v. trên cây ngô. Trình tự khởi động được ưu tiên hạt còn bao gồm các trình tự khởi động biểu hiện gen trực tiếp chủ yếu đối với các mô cụ thể trong hạt, ví dụ, trình tự khởi động được ưu tiên nội nhũ của γ -zein, trình tự khởi động cryptic từ cây thuốc lá (Fobert et al. 1994. T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco. *Plant J.* 4: 567-577), trình tự khởi động gen P từ cây ngô (Chopra et al. 1996. Alleles of the maize P gene with distinct tissue specificities encode Myb-homologous proteins with C-terminal replacements. *Plant Cell* 7:1149-1158, Erratum in *Plant Cell*.1997, 1:109), trình tự khởi động globulin-1 từ cây ngô (Belanger and Kriz.1991. Molecular basis for Allelic Polymorphism of the maize Globulin-1 gene. *Genetics* 129: 863-972), và các trình tự khởi động biểu hiện trực tiếp đối với áo hoặc vỏ hạt của hạt ngô, ví dụ, trình tự khởi động glutamin syntetaza đặc hiệu vỏ quả (Muhitch et al., 2002. Isolation of a Promoter Sequence From the Glutamine Synthetase_{1,2} Gene Capable of Conferring Tissue-Specific Gene Expression in Transgenic Maize. *Plant Science* 163:865-872).

Ngoài trình tự khởi động, vector biểu hiện thường chứa đơn vị phiên mã hoặc băng biểu hiện mà chứa tất cả các phần tử bổ sung cần để biểu hiện axit nucleic trong tế bào vật chủ, là sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật có nhân điển hình. Do đó, băng biểu hiện điển hình chứa trình tự khởi động được liên kết có điều khiển, ví dụ, với trình tự axit nucleic mã hóa protein, và các tín hiệu cần thiết, ví dụ, cho sự polyadenyl hóa hiệu quả của sản phẩm phiên mã, sự kết thúc phiên mã, các vị trí gắn kết ribosom, hoặc sự kết thúc dịch mã. Các phần tử bổ sung của băng này có thể bao gồm, ví dụ, các gen tăng cường và các tín hiệu ghép nối khác loại.

Các thành phần khác của vector có thể được bao gồm, còn tùy theo mục đích sử dụng dự định của gen. Ví dụ bao gồm các chất đánh dấu để chọn lọc, trình tự đích hoặc điều hòa, trình tự peptit vận chuyển như trình tự peptit vận chuyển được tối ưu hóa (xem US 5,510,471) trình tự ổn định như RB7 MAR (xem Thompson and Myatt, (1997) *Plant Mol. Biol.*, 34: 687-692 và WO9727207) hoặc trình tự dẫn đầu, intron v.v.. Việc mô tả tổng quát và các ví dụ về vector biểu hiện thực vật và gen chỉ thị có thể được tìm thấy trong Gruber, et al., "Vectors for Plant Transformation" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al eds; CRC Press pp. 89-119 (1993).

Việc lựa chọn vector biểu hiện thích hợp sẽ phụ thuộc vào vật chủ và phương pháp đưa vector biểu hiện vào vật chủ. Bảng biểu hiện có thể bao gồm, ở đầu tận cùng 3' của trình tự nucleotit khác loại cần quan tâm, vùng kết thúc phiên mã và dịch mã có chức năng trong thực vật. Vùng kết thúc có thể là nguyên thể với trình tự ADN cần quan tâm hoặc có thể có nguồn gốc từ một nguồn khác. Các vùng kết thúc thuận lợi có thể có sẵn từ plasmid Ti của *A. tumefaciens*, như các vùng kết thúc octopin syntaza và nopaline syntaza (nos) (Depicker et al., *Mol. and Appl. Genet.* 1:561-573 (1982) and Shaw et al. (1984) *Nucleic Acids Research* vol. 12, No. 20 pp7831-7846(nos)); cũng xem Guerineau et al. *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144 (1991); Proudfoot, *Cell* 64:671-674 (1991); Sanfacon et al. *Genes Dev.* 5:141-149 (1991); Mogen et al. *Plant Cell* 2:1261-1272 (1990); Munroe et al. *Gene* 91:151-158 (1990); Ballas et al. *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903 (1989); Joshi et al. *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639 (1987).

Bảng biểu hiện có thể chứa trình tự dẫn đầu 5'. Các trình tự dẫn đầu này có thể có tác dụng làm tăng việc dịch mã. Các đoạn dẫn đầu dịch mã là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ, đoạn dẫn đầu picornavirut, đoạn dẫn đầu EMCV (vùng không mã hóa 5' bệnh viêm não-cơ tim), Elroy-Stein et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130 (1989); đoạn dẫn đầu potyvirus, ví dụ, đoạn dẫn đầu TEV (Tobacco Etch Virus - virus gây bệnh ký axit thuốc lá) Carrington and Freed, *Journal of Virology*, 64:1590-1597 (1990), đoạn dẫn đầu MDMV (Maize Dwarf Mosaic Virus - virus gây bệnh khảm lùn ngô), Allison et al., *Virology* 154:9-20 (1986); protein gắn kết chuỗi nặng globulin miễn dịch của người (BiP), Macejak et al. *Nature* 353:90-94 (1991); đoạn dẫn đầu không được dịch mã từ mARN protein áo ngoài của virus gây bệnh khảm cỏ linh lăng (AMV ARN 4), Jobling et al. *Nature* 325:622-625 (1987);

đoạn dẫn đầu virus gây bệnh khảm thuốc lá (Tobacco mosaic virus - TMV), Gallie et al. (1989) *Molecular Biology of RNA*, pages 237-256; và đoạn dẫn đầu virus gây bệnh đốm vàng ngô (maize chlorotic mottle virus - MCMV) Lommel et al. *Virology* 81:382-385 (1991). Cũng xem Della-Cioppa et al. *Plant Physiology* 84:965-968 (1987).

Cấu trúc này cũng có thể chứa các trình tự làm tăng việc dịch mã và/hoặc độ ổn định mARN như các intron. Ví dụ về một intron như vậy là intron thứ nhất của gen II của biến thể histon H3.III của *Arabidopsis thaliana*. Chaubet et al. *Journal of Molecular Biology*, 225:569-574 (1992).

Trong các trường hợp đó khi mong muốn có sản phẩm được biểu hiện của trình tự nucleotit khác loại trực tiếp đối với bào quan cụ thể, đặc biệt là lục thể, hạt tinh bột, hoặc đối với mạng lưới nội chất, hoặc được tiết ở bề mặt của tế bào hoặc ngoại bào, thì bằng biểu hiện này có thể còn bao gồm trình tự mã hóa đối với peptit vận chuyển. Các peptit vận chuyển này là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, peptit vận chuyển đối với protein mang axyl, tiểu đơn vị nhỏ của RUBISCO, EPSP syntaza thực vật và *Helianthus annuus* (xem Lebrun và các đồng tác giả, US 5,510,417), peptit vận chuyển lục thể *Zea mays* Brittle-1 (Nelson et al. *Plant Physiol.* 117(4):1235-1252 (1998); Sullivan et al. *Plant Cell* 3(12):1337-48; Sullivan et al., *Planta* (1995) 196(3):477-84; Sullivan et al., *J. Biol. Chem.* (1992) 267(26):18999-9004) và các loại tương tự. Ngoài ra, các peptit vận chuyển lục thể khảm là đã biết trong lĩnh vực này, như peptit vận chuyển được tối ưu hóa (xem, US 5,510,471). Các peptit vận chuyển lục thể khác đã được mô tả trước đây trong US 5,717,084; US 5,728,925. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng biết được nhiều tùy chọn khả dụng trong việc biểu hiện sản phẩm đối với bào quan cụ thể. Ví dụ, trình tự alpha amylaza lúa mạch thường được sử dụng để biểu hiện trực tiếp đối với mạng lưới nội chất. Rogers, *J. Biol. Chem.* 260:3731-3738 (1985).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng việc sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể cải thiện việc kiểm soát biểu hiện của các phân tử axit nucleic chuyển nhiễm bằng cách thao tác, ví dụ, số lượng bản sao của các phân tử axit nucleic trong tế bào vật chủ, hiệu quả phiên mã các phân tử axit nucleic, hiệu quả dịch mã sản phẩm phiên mã thu được, và hiệu quả của các cải biến sau dịch mã. Ngoài ra, trình tự khởi động có thể được xử lý kỹ thuật di truyền để cải thiện mức

độ biểu hiện so với trình tự khởi động nguyên thể. Các kỹ thuật tái tổ hợp hữu ích để kiểm soát sự biểu hiện của các phân tử axit nucleic bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kết hợp ổn định các phân tử axit nucleic vào một hoặc nhiều nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ, bổ sung các trình tự ổn định vector vào các plasmid, thay thế hoặc cải biến các tín hiệu kiểm soát phiên mã (ví dụ, các trình tự khởi động, gen vận hành, gen tăng cường), thay thế hoặc cải biến các tín hiệu kiểm soát dịch mã (ví dụ, vị trí gắn kết ribosom, các trình tự Shine-Dalgarno hoặc Kozak), cải biến các phân tử axit nucleic để tương ứng với việc sử dụng codon của tế bào vật chủ, và loại bỏ trình tự làm mất ổn định sản phẩm phiên mã.

Gen chỉ thị hoặc đánh dấu để chọn lọc các tế bào biến nạp hoặc mô hoặc phần thực vật hoặc thực vật có thể được bao gồm trong các vector biến nạp. Ví dụ về các chất đánh dấu để chọn lọc bao gồm các chất đánh dấu truyền tính kháng với các chất kháng chuyển hóa như các thuốc diệt cỏ hoặc thuốc kháng sinh, ví dụ, dihydrofolat reductaza truyền tính kháng metotrexat (Reiss, Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 13:143-149, 1994; cũng xem Herrera Estrella et al., Nature 303:209-213, 1983; Meijer et al., Plant Mol. Biol. 16:807-820, 1991); neomycin phosphotransferaza, truyền tính kháng các aminoglycosit neomycin, kanamycin và paromycin (Herrera-Estrella, EMBO J. 2:987-995, 1983 and Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 80:4803 (1983)); hygromycin phosphotransferaza, truyền tính kháng hygromycin (Marsh, Gene 32:481-485, 1984; cũng xem Waldron et al., Plant Mol. Biol. 5:103-108, 1985; Zhijian et al., Plant Science 108:219-227, 1995); trpB, cho phép các tế bào sử dụng indol thay cho tryptophan; hisD, cho phép các tế bào sử dụng histinol thay cho histidin (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:8047, 1988); mannoza-6-phosphat isomeraza cho phép các tế bào sử dụng mannoza (WO 94/20627); ornitin decarboxylaza, truyền tính kháng chất ức chế ornitin decarboxylaza, 2-(điflometyl)-DL-ornitin (DFMO; McConlogue, 1987, trong: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.); và deaminaza từ *Aspergillus terreus*, truyền tính kháng Blasticidin S (Tamura, Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:2336-2338, 1995).

Các chất đánh dấu để chọn lọc khác bao gồm, ví dụ, thể đột biến axetolactat syntaza, truyền tính kháng imidazolinon hoặc sulfonylure (Lee et al., EMBO J. 7:1241-1248, 1988), thể đột biến psbA, truyền tính kháng atrazin (Smeda et al., Plant Physiol. 103:911-917, 1993), hoặc thể đột biến protoporphyrinogen oxidaza (xem US

5,767,373), hoặc các chất đánh dấu khác truyền tính kháng thuốc diệt cỏ như glufosinat. Ví dụ về các gen đánh dấu để chọn lọc thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gen mã hóa tính kháng chloramphenicol (Herrera Estrella et al., EMBO J. 2:987-992, 1983); streptomycin (Jones et al., Mol. Gen. Genet. 210:86-91, 1987); spectinomycin (Bretagne-Sagnard et al., Transgenic Res. 5:131-137, 1996); bleomycin (Hille et al., Plant Mol. Biol. 7:171-176, 1990); sulfonamid (Guerineau et al., Plant Mol. Biol. 15:127-136, 1990); bromoxynil (Stalker et al., Science 242:419-423, 1988); glyphosat (Shaw et al., Science 233:478-481, 1986); phosphinothrixin (DeBlock et al., EMBO J. 6:2513-2518, 1987), và các gen tương tự.

Một tùy chọn cho việc sử dụng gen chọn lọc là ADN mã hóa tính kháng glufosinat và theo một phương án có thể là phosphinothrixin axetyl transferaza (*pat*), gen *pat* hoặc gen *bar* được tối ưu hóa ở ngô dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động virus gây bệnh khảm gân trên sắn. Các gen này truyền tính kháng bialaphos. Xem, (xem, Wohlleben et al., (1988) *Gene* 70: 25-37); Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2:603; 1990; Uchimiya et al., BioTechnology 11:835, 1993; White et al., Nucl. Acids Res. 18:1062, 1990; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79:625-631, 1990; và Anzai et al., Mol. Gen. Gen. 219:492, 1989). Một phiên bản của gen *pat* là gen *pat* được tối ưu hóa ở ngô, được mô tả trong US 6,096,947.

Ngoài ra, các gen đánh dấu tạo thuận lợi cho việc xác định tế bào thực vật chứa polynucleotit mã hóa gen đánh dấu này có thể được dùng. Các gen đánh dấu dễ tính điểm hoặc dễ sàng lọc là hữu ích, trong đó sự có mặt của trình tự tạo ra sản phẩm dễ đánh giá và có thể tạo ra sản phẩm này mà không phá hủy tế bào thực vật. Các ví dụ bao gồm gen β -glucuronidaza, hoặc *uidA* (GUS), mã hóa enzym mà các chất sinh màu khác nhau đối với enzym này là đã biết (ví dụ, US 5,268,463 và US 5,599,670); chloramphenicol axetyl transferaza (Jefferson et al. The EMBO Journal vol. 6 No. 13 pp. 3901-3907); và phosphataza kiềm. Theo một phương án được ưu tiên, gen đánh dấu được sử dụng là beta-caroten hoặc tiền vitamin A (Ye et al., Science 287:303-305- (2000)). Gen này đã được sử dụng để làm tăng dinh dưỡng của cây lúa, nhưng trong trường hợp này, nó được dùng thay thế làm gen đánh dấu dễ sàng lọc, và sự có mặt của gen được liên kết với gen cần quan tâm được phát hiện bằng màu vàng tạo ra. Không giống trường hợp trong đó gen được sử dụng để đóng góp dinh dưỡng cho thực vật, một lượng protein nhỏ hơn là đủ cho mục đích đánh dấu. Các gen đánh dấu dễ sàng lọc

khác bao gồm các gen anthoxyanin/flavonoit nói chung (xem bàn luận trong Taylor and Briggs, *The Plant Cell* (1990)2:115-127) bao gồm, ví dụ, gen locut R, mã hóa sản phẩm điều hòa sự sản xuất của chất màu anthoxyanin (màu đỏ) trong các mô thực vật (Dellaporta et al., in *Chromosome Structure and Function*, Kluwer Academic Publishers, Appels and Gustafson eds., pp. 263-282 (1988)); các gen kiểm soát sinh tổng hợp của chất màu flavonoit, như gen C1 ở ngô (Kao et al., *Plant Cell* (1996) 8: 1171-1179; Scheffler et al., *Mol. Gen. Genet.* (1994) 242:40-48) và C2 ở ngô (Wienand et al., *Mol. Gen. Genet.* (1986) 203:202-207); gen B (Chandler et al., *Plant Cell* (1989) 1:1175-1183), gen p1 (Grotewold et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1991) 88:4587-4591; Grotewold et al., *Cell* (1994) 76:543-553; Sidorenko et al., *Plant Mol. Biol.* (1999)39:11-19); gen locut màu đồng (bronze) (Ralston et al., *Genetics* (1988) 119:185-197; Nash et al., *Plant Cell* (1990) 2(11): 1039-1049), trong số các gen khác.

Các ví dụ khác về các gen đánh dấu thích hợp bao gồm gen protein huỳnh quang xanh lục-lam (cyan fluorescent protein - CYP) (Bolte et al. (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54 and Kato et al. (2002) *Plant Physiol* 129: 913-42), gen protein huỳnh quang vàng (PHIYFP™ từ Evrogen; xem Bolte et al. (2004) *J. Cell Science* 117: 943-54); gen lux, mã hóa luxiferaza, sự có mặt của nó có thể được phát hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, phim tia X, đếm nhấp nháy, phép đo quang phổ huỳnh quang, các máy quay video độ sáng thấp, các máy quay đếm photon hoặc máy đọc huỳnh quang nhiều lỗ (Teeri et al. (1989) *EMBO J.* 8:343); gen protein huỳnh quang xanh lục (green fluorescent protein - GFP) (Sheen et al., *Plant J.* (1995) 8(5):777-84); và DsRed2 trong đó các tế bào thực vật được biến nạp bằng gen đánh dấu có màu đỏ, và do đó có thể chọn được bằng mắt thường (Dietrich et al. (2002) *Biotechniques* 2(2):286-293). Các ví dụ khác bao gồm gen β -lactamaza (Sutcliffe, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* (1978) 75:3737), mã hóa enzym mà các chất sinh màu khác nhau đối với enzym này là đã biết (ví dụ, PADAC, cephalosporin sinh màu); gen xyle (Zukowsky et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* (1983) 80:1101), mã hóa catechol dioxygenaza có thể chuyển hóa các catechol sinh màu; gen α -amylaza (Ikuta et al., *Biotech.* (1990) 8:241); và gen tyrosinaza (Katz et al., *J. Gen. Microbiol.* (1983) 129:2703), mã hóa enzym có khả năng oxy hóa tyrosin thành DOPA và dopaquinon, chất này sau đó ngưng tụ tạo thành hợp chất melanin dễ phát hiện được. Rõ ràng, nhiều gen đánh dấu như vậy là có sẵn và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

IV. Các tế bào và sinh vật chứa DGT-28

Theo một số phương án, tế bào và/hoặc sinh vật (ví dụ, tế bào thực vật hoặc thực vật) theo sáng chế chứa polypeptit khác loại có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1. Theo các phương án cụ thể, tế bào và/hoặc sinh vật theo sáng chế chứa axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1; ví dụ, axit nucleic *dgt-28*. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào và/hoặc sinh vật chứa axit nucleic khác loại lai với một axit nucleic khác có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao.

Tế bào thực vật, phần thực vật, và/hoặc thực vật có thể được cải biến di truyền để chứa polypeptit khác loại (ví dụ, protein DGT-28) và/hoặc axit nucleic khác loại (ví dụ, axit nucleic *dgt-28*) bằng một số phương pháp đưa phân tử khác loại vào bất kì đã biết trong lĩnh vực này. Theo các phương án cụ thể trong bản mô tả này, phân tử khác loại được đưa vào tế bào thực vật, phần thực vật, và/hoặc thực vật bằng phương pháp được chọn từ, ví dụ và không giới hạn ở: biến nạp và gây giống chọn lọc (ví dụ, gây giống bằng lai ngược).

Loài thực vật hoặc tế bào thực vật bất kì có thể được cải biến di truyền để chứa polypeptit và/hoặc axit nucleic khác loại trong bản mô tả này. Theo một số phương án, tế bào thực vật được cải biến di truyền sao cho không có khả năng tái sinh để tạo ra thực vật. Theo một số phương án, các thực vật được cải biến di truyền theo sáng chế này (ví dụ, tế bào thực vật chủ) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thực vật bậc cao, thực vật hai lá mầm, thực vật một lá mầm, thực vật có thể ăn được, cây trồng, và thực vật được dùng để lấy dầu (ví dụ, cây hạt dầu). Các thực vật này bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: cỏ linh lăng; cây đậu tương; cây bông; hạt cải dầu (cây canola); hạt lanh; cây ngô; cây lúa; cỏ *brachiaria*; cây lúa mì; cây rum; cây cao lương; cây củ cải đường; cây hướng dương; cây thuốc lá; và cỏ (ví dụ, lớp cỏ). Trong các ví dụ cụ thể, tế bào thực vật hoặc thực vật được cải biến di truyền trong bản mô tả này bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: *Brassica napus*; mù tạc Ấn độ (*Brassica juncea*); mù tạc Etiopia (*Brassica carinata*); cây củ cải (*Brassica rapa*); cải bắp (*Brassica oleracea*); *Glycine max*; *Linum usitatissimum*; *Zea mays*; *Carthamus tinctorius*; *Helianthus annuus*; *Nicotiana tabacum*; *Arabidopsis thaliana*, quả hạch Brazil (*Betholettia excelsa*); hạt thầu dầu (*Ricinus communis*); cây dừa (*Cocos nucifera*); cây rau mùi (*Coriandrum sativum*); *Gossypium spp.*; cây lạc (*Arachis hypogaea*); cây jojoba (*Simmondsia*

chinensis); cây cọ dầu (*Elaeis guineensis*); cây oliu (*Olea europaea*); *Oryza sativa*; cây bí (*Cucurbita maxima*); cây lúa mạch (*Hordeum vulgare*); cây mía (*Saccharum officinarum*); *Triticum spp.* (kể cả *Triticum durum* và *Triticum aestivum*); và bèo tấm (*Lemnaceae sp.*). Theo một số phương án, thực vật này có thể có cơ sở di truyền cụ thể, liên quan đến các cây trồng ưu tú, cây trồng kiểu đại, và các giống có thể phân biệt được trên thị trường.

Các axit nucleic được đưa vào tế bào thực vật có thể được sử dụng để truyền các tính trạng mong muốn trên thực vật bất kỳ cần thiết. Nhiều thực vật và hệ tế bào thực vật có thể được xử lý kỹ thuật đối với các đặc tính sinh lý học và nông học mong muốn được mô tả trong bản mô tả này bằng cách sử dụng axit nucleic mã hóa polypeptit DGT và các phương pháp biến nạp khác nhau. Các phương án trong bản mô tả này có thể sử dụng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp để biến nạp thực vật (và tạo ra các thực vật được cải biến di truyền), các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực. Nhiều phương pháp để biến nạp thực vật đã được nghiên cứu, bao gồm các quy trình biến nạp sinh học và vật lý cho thực vật hai lá mầm, cũng như thực vật một lá mầm (Xem, ví dụ, Goto-Fumiyuki et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:282-6; Miki et al. (1993) *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* (Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp. 67-88). Ngoài ra, các vector và các phương pháp nuôi cấy *in vitro* để biến nạp tế bào và mô thực vật và tái sinh thực vật được mô tả trong, ví dụ, Gruber et al. (1993), nêu trên, ở trang 89-119.

Các kỹ thuật biến nạp thực vật có sẵn để đưa axit nucleic vào tế bào thực vật chủ bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: biến nạp bằng T-ADN bị vô hiệu hóa sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *A. rhizogenes* làm tác nhân biến nạp; chuyển nhiễm canxi phosphat; biến nạp bằng polybren; dung hợp thể nguyên sinh; điện di (D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-505); phương pháp siêu âm (ví dụ, tạo lỗ màng bằng sóng âm); biến nạp liposom; vi tiêm; tiếp xúc với ADN trần; tiếp xúc với các vector plasmit; tiếp xúc với các vector virut; hệ thống phân phối hạt biolistic (ví dụ, bắn phá hạt ADN (xem, ví dụ, Klein et al. (1987) *Nature* 327:70-3) và bắn vi hạt (Sanford et al. (1987) *Part. Sci. Technol.* 5:27; Sanford (1988) *Trends Biotech.* 6:299, Sanford (1990) *Physiol. Plant* 79:206; và Klein et al. (1992) *Biotechnology* 10:268); biến nạp qua trung gian silic cacbua WHISKERS (Kaeppeler et al. (1990) *Plant Cell Rep.* 9:415-8); biến nạp bằng hạt nano (xem, ví dụ, US 2009/0104700A1); phát chùm sol khí; và hấp

thu qua trung gian polyetylen glycol (PEG). Trong các ví dụ cụ thể, axit nucleic khác loại có thể được đưa trực tiếp vào ADN hệ gen của tế bào thực vật.

Phương pháp được dùng một cách rộng rãi để đưa vector biểu hiện vào thực vật là dựa trên hệ thống biến nạp tự nhiên của *Agrobacterium*. Horsch et al. (1985) Science 227:1229. *A. tumefaciens* và *A. rhizogenes* là vi khuẩn trong đất gây bệnh thực vật đã biết là hữu ích để biến nạp di truyền các tế bào thực vật. Các plasmid Ti và Ri của *A. tumefaciens* và *A. rhizogenes*, lần lượt, mang các gen chịu trách nhiệm về biến nạp di truyền của thực vật. Kado (1991) Crit. Rev. Plant. Sci. 10:1. Chi tiết về các hệ vector *Agrobacterium* và các phương pháp chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* cũng có trong, ví dụ, Gruber và các đồng tác giả, nêu trên, Miki và các đồng tác giả, nêu trên, Moloney et al. (1989) Plant Cell Reports 8:238, và US 4,940,838 và US 5,464,763.

Nếu *Agrobacterium* được sử dụng để biến nạp, ADN cần cài xen thông thường được tách dòng vào các plasmid riêng biệt; vào vector trung gian hoặc vector kép. Các vector trung gian không tự nhân lên được trong *Agrobacterium*. Vector trung gian này có thể được chuyển vào *A. tumefaciens* bằng plasmid hỗ trợ (tiếp hợp). Hệ siêu kép ở cây thuốc lá Nhật Bản là ví dụ về hệ như vậy (được xem xét bởi Komari et al. (2006) Methods in Molecular Biology (K. Wang, ed.) No. 343; *Agrobacterium* Protocols, 2nd Edition, Vol. 1, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp.15-41; và Komori et al. (2007) Plant Physiol. 145:1155-60). Các vector kép có thể tự nhân lên cả trong *E. coli* và trong *Agrobacterium*. Các vector kép bao gồm gen đánh dấu chọn lọc và vùng nối hoặc vùng đa nối được tạo khung bởi các vùng bờ T-ADN phải và trái. Chúng có thể được biến nạp trực tiếp vào *Agrobacterium* (Holsters, 1978). *Agrobacterium* chứa plasmid mang vùng *vir*. Plasmid Ti hoặc Ri cũng chứa vùng *vir* cần thiết để chuyển T-ADN. Vùng *vir* là cần thiết để chuyển T-ADN vào tế bào thực vật. Chúng có thể chứa T-DNA khác.

Chức năng độc lực của vật chủ *Agrobacterium tumefaciens* sẽ hướng tới việc xen sợi T chứa cấu trúc và gen đánh dấu liền kề vào ADN của tế bào thực vật khi tế bào này bị nhiễm vi khuẩn bằng cách sử dụng vector T ADN kép (Bevan (1984) Nuc. Acid Res. 12:8711-21) hoặc quy trình đồng nuôi cấy (Horsch et al. (1985) Science 227:1229-31). Thông thường, hệ thống biến nạp *Agrobacterium* được sử dụng để xử lý kỹ thuật cây hai lá mầm. Bevan et al. (1982) Ann. Rev. Genet 16:357-84; Rogers et al. (1986) Methods Enzymol. 118:627-41. Hệ thống biến nạp *Agrobacterium* cũng có thể được sử dụng để biến nạp, cũng như chuyển, các axit nucleic vào thực vật và tế bào

thực vật một lá mầm. Xem US 5,591,616; Hernalsteen et al. (1984) EMBO J 3:3039-41; Hooykass-Van Slogteren et al. (1984) Nature 311:763-4; Grimsley et al. (1987) Nature 325:1677-9; Boulton et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12:31-40; và Gould et al. (1991) Plant Physiol. 95:426-34.

Các thao tác di truyền của vật chủ tái tổ hợp trong bản mô tả này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền và sàng lọc chuẩn, và có thể được thực hiện trong tế bào vật chủ bất kì thích hợp để thao tác di truyền. Theo một số phương án, tế bào vật chủ tái tổ hợp có thể là sinh vật hoặc vi sinh vật chủ bất kì thích hợp để cải biến di truyền và/hoặc biểu hiện gen tái tổ hợp. Theo một số phương án, vật chủ tái tổ hợp có thể là thực vật. Các kỹ thuật tách dòng phân tử và ADN tái tổ hợp chuẩn được sử dụng trong bản mô tả này là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và được mô tả trong, ví dụ và không giới hạn ở: Sambrook và các đồng tác giả (1989), nêu trên; Silhavy et al. (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; và Ausubel et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York, NY.

Sau khi đưa axit nucleic vào tế bào thực vật, tế bào thực vật này có thể được trồng, và khi xuất hiện mô biệt hóa như cành non và rễ, thì thực vật trưởng thành có thể được tạo ra. Theo một số phương án, nhiều thực vật có thể được tạo ra. Các phương pháp để tái sinh thực vật là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình có trình độ trung bình trong lĩnh vực này và có thể được tìm thấy trong, ví dụ: *Plant Cell and Tissue Culture*, 1994, Vasil and Thorpe Eds. Kluwer Academic Publishers and in: *Plant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology 111, 1999 Hall Eds Humana Press)*. Các thực vật được cải biến di truyền được mô tả trong bản mô tả này có thể được nuôi cấy trong môi trường lên men hoặc được trồng trong môi trường thích hợp như đất. Theo một số phương án, môi trường phát triển thích hợp đối với thực vật bậc cao có thể là môi trường phát triển bất kì cho thực vật, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, đất, cát, môi trường hạt khác bất kì hỗ trợ cho sự sinh trưởng rễ (ví dụ, chất khoáng bón cây, đá trân châu, v.v.) hoặc môi trường trồng cây trong nước, cũng như ánh sáng, nước và các chất bổ sung dinh dưỡng thích hợp tạo thuận lợi cho sự sinh trưởng của thực vật bậc cao này.

Các tế bào thực vật biến nạp được tạo ra bằng kỹ thuật biến nạp bất kì trên đây có thể được nuôi cấy để tái tạo thực vật hoàn chỉnh có kiểu gen được biến nạp, và do đó,

có kiểu hình mong muốn. Các kỹ thuật tái sinh như vậy dựa trên việc sử dụng một số hormon thực vật nhất định trong môi trường phát triển nuôi cấy mô, thông thường là dựa trên chỉ dẫn của thuốc diệt sinh vật và/hoặc thuốc diệt cỏ đã được đưa vào cùng với các trình tự nucleotit mong muốn. Việc tái sinh thực vật từ thể nguyên sinh được nuôi cấy được mô tả trong Evans, et al., "Protoplasts Isolation and Culture" in *Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, Macmillian Publishing Company, New York, 1983; và Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Việc tái sinh cũng có thể thu được từ mô sẹo, mảnh cây, cơ quan, phần hoa, phôi của thực vật hoặc các phần của chúng. Các kỹ thuật tái sinh như vậy thường được mô tả trong Klee et al. (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486.

Theo các phương án khác, các tế bào thực vật được biến nạp là không có khả năng tái sinh để tạo ra thực vật. Các tế bào này có thể được dùng, ví dụ, trong việc phát triển dòng tế bào thực vật có kiểu hình liên quan, ví dụ, tính kháng thuốc diệt cỏ.

Tế bào thực vật, mô sẹo, mô hoặc thực vật được biến nạp có thể được xác định và phân lập bằng cách lựa chọn hoặc sàng lọc nguyên liệu thực vật được xử lý kỹ thuật về các tính trạng được mã hóa bởi các gen đánh dấu có mặt trên ADN biến nạp. Ví dụ, việc lựa chọn có thể được thực hiện bằng cách trồng nguyên liệu thực vật được xử lý kỹ thuật trên môi trường chứa một lượng có tác dụng ức chế của thuốc kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ mà cấu trúc gen biến nạp tạo ra tính kháng. Ngoài ra, các thực vật và tế bào thực vật được biến nạp cũng có thể được xác định bằng cách sàng lọc đối với các hoạt tính của các gen đánh dấu có thể thấy được bất kì (ví dụ, gen β -glucuronidaza, gen luxiferaza, hoặc gen gfp) có thể có mặt trong cấu trúc axit nucleic tái tổ hợp. Các phương pháp lựa chọn và sàng lọc như vậy là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thực vật chuyển gen chứa phân tử khác loại trong bản mô tả này có thể được tạo ra qua việc gây giống chọn lọc, ví dụ, bằng cách lai hữu tính thực vật bố mẹ thứ nhất chứa phân tử này, và thực vật bố mẹ thứ hai, từ đó tạo ra nhiều thực vật con cháu thứ nhất. Sau đó, thực vật con cháu thứ nhất có thể được lựa chọn cây có tính kháng chất đánh dấu để chọn lọc (ví dụ, glyphosat, tính kháng chất này có thể được tạo ra ở thực vật con cháu bằng phân tử khác loại trong bản mô tả này). Tiếp theo, thực vật con cháu thứ nhất có thể được tự phối, từ đó tạo nhiều thực vật con cháu thứ hai. Sau đó, thực vật con cháu thứ hai có thể được chọn về tính kháng chất đánh dấu để chọn lọc. Các

bước này có thể còn bao gồm việc lai ngược thực vật con cháu thứ nhất hoặc thực vật con cháu thứ hai với thực vật bố mẹ thứ hai hoặc thực vật bố mẹ thứ ba.

Cũng cần hiểu rằng hai thực vật chuyển gen khác nhau cũng có thể được giao phối để tạo ra con chứa hai gen ngoại sinh bổ sung, phân ly một cách độc lập. Việc tự phối của con cháu thích hợp có thể tạo ra các thực vật là đồng hợp tử đối với cả hai gen ngoại sinh bổ sung. Việc lai ngược với thực vật bố mẹ và lai ngoài dòng với thực vật không chuyển gen cũng được tính đến, như là việc nhân giống vô tính. Các phương pháp gây giống khác thường được sử dụng đối với các tính trạng và cây trồng khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này. Việc lai ngược đã được sử dụng để chuyển các gen mã hóa tính trạng dễ di truyền cao, được di truyền đơn giản vào cây trồng đồng hợp tử mong muốn hoặc dòng lai cùng dòng, là bố mẹ tái tục. Thực vật thu được được mong đợi có các thuộc tính của bố mẹ tái tục (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được chuyển từ bố mẹ cho. Sau khi lai ban đầu, các cá thể có kiểu hình của bố mẹ cho được chọn và lai lặp đi lặp lại (lai ngược) với bố mẹ tái tục. Bố mẹ thu được được mong đợi có các thuộc tính của bố mẹ tái tục (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được chuyển từ bố mẹ cho.

Axit nucleic cũng có thể được đưa vào vùng định trước của hệ gen thực vật thông qua sự tái tổ hợp tương đồng. Các phương pháp để hợp nhất ổn định trình tự polynucleotit vào trong vị trí nhiễm sắc thể cụ thể của tế bào thực vật thông qua sự tái tổ hợp tương đồng đã được mô tả trong lĩnh vực này. Ví dụ, sự hợp nhất đặc hiệu vị trí như được mô tả trong US 2009/0111188 A1 liên quan đến việc sử dụng các enzym tái tổ hợp di truyền hoặc các enzym hợp nhất để gián tiếp đưa trình tự polynucleotit cho vào đích nhiễm sắc thể. Ngoài ra, đơn yêu cầu cấp patent quốc tế số WO 2008/021207, mô tả sự tái tổ hợp tương đồng gián tiếp qua ngón tay kẽm để hợp nhất ổn định một hoặc nhiều trình tự polynucleotit cho vào trong vị trí cụ thể của hệ gen. Việc sử dụng các enzym tái tổ hợp di truyền như FLP/FRT như được mô tả trong US 6,720,475, hoặc CRE/LOX như được mô tả trong US 5,658,772, có thể được dùng để hợp nhất ổn định trình tự polynucleotit vào trong vị trí cụ thể của nhiễm sắc thể. Cuối cùng, việc sử dụng các meganucleaza để hướng đích các polynucleotit cho vào vị trí cụ thể của nhiễm sắc thể được mô tả trong Puchta et al., *PNAS USA* 93 (1996) pp. 5055-5060).

Các phương pháp khác nhau khác để hợp nhất đặc hiệu vị trí vào trong tế bào thực vật nói chung là đã biết và có thể áp dụng được (Kumar et al., *Trends in Plant*

Sci. 6(4) (2001) pp. 155-159). Ngoài ra, các hệ thống tái tổ hợp đặc hiệu vị trí đã được nhận diện trong một số sinh vật chưa có nhân điển hình và sinh vật có nhân điển hình bậc thấp có thể được ứng dụng để sử dụng trong thực vật. Ví dụ về các hệ thống này bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: hệ thống enzym tái tổ hợp di truyền R/RS từ plasmit pSR1 của nấm men *Zygosaccharomyces rouxii* (Araki et al. (1985) *J. Mol. Biol.* 182: 191-203), và hệ thống Gin/gix của thể thực khuẩn Mu (Maeser and Kahlmann (1991) *Mol. Gen. Genet.* 230: 170-176).

Theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 có thể tùy ý được kết hợp với một axit nucleic khác trong tế bào và/hoặc sinh vật chủ. Ví dụ, theo một số phương án, axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 có thể được kết hợp hoặc “xếp chồng” với một axit nucleic khác tạo ra tính kháng hoặc tính chống chịu bổ sung với glyphosat hoặc một thuốc diệt cỏ khác, và/hoặc một axit nucleic khác tạo ra tính kháng côn trùng hoặc bệnh được chọn và/hoặc chất tăng cường dinh dưỡng, và/hoặc đặc tính nông học cải thiện, và/hoặc một axit nucleic khác tạo ra các protein hoặc các sản phẩm khác hữu ích trong thức ăn, thực phẩm, các mục đích công nghiệp, mục đích dược phẩm hoặc các mục đích khác. Việc “xếp chồng” hai hoặc nhiều trình tự axit nucleic cần quan tâm trong hệ gen thực vật có thể được thực hiện, ví dụ, thông qua việc gây giống thực vật thông thường bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều biến thể gen, biến nạp thực vật bằng (các) cấu trúc chứa các axit nucleic, tái biến nạp thực vật chuyển gen, hoặc bổ sung các tính trạng mới qua sự hợp nhất đích thông qua sự tái tổ hợp tương đồng.

Các axit nucleic có thể “được xếp chồng” với axit nucleic khác loại mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở:

Các gen hoặc trình tự mã hóa (ví dụ, iARN (ARN can thiệp)) truyền tính kháng vật gây hại hoặc bệnh

(A) Các gen kháng bệnh thực vật. Sự bảo vệ của thực vật thường được kích hoạt bởi tương tác cụ thể giữa sản phẩm của gen kháng bệnh (R) trong thực vật này và sản phẩm của gen không nhiễm bệnh (avirulence - Avr) tương ứng ở mầm bệnh. Nhiều thực vật có thể được biến nạp bằng gen kháng tách dòng để xử lý thực vật sao cho thực

vật này kháng các chủng mầm bệnh cụ thể. Ví dụ về các gen này bao gồm, gen Cf-9 ở cà chua để kháng *Cladosporium fulvum* (Jones et al., 1994 Science 266:789), gen *Pto* ở cà chua, mã hóa protein kinaza, để kháng *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Martin et al., 1993 Science 262:1432), và gen RSSP2 *Arabidopsis* để kháng *Pseudomonas syringae* (Mindrinos et al., 1994 Cell 78:1089).

(B) Protein *Bacillus thuringiensis*, dẫn xuất của nó hoặc polypeptit tổng hợp được tạo mô hình trên đó, như, trình tự nucleotit của gen nội độc tố δ *Bt* (Geiser et al., 1986 Gene 48:109), và gen protein sinh dưỡng trừ sâu (vegetative insecticidal protein - VIP) (xem, ví dụ, Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94). Ngoài ra, các phân tử ADN mã hóa các gen nội độc tố δ có thể được mua từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (American Type Culture Collection) (Rockville, Md.), với số lưu giữ ATCC 40098, 67136, 31995 và 319931998.

(C) Lectin, như, các trình tự nucleotit của một số gen lectin gắn kết mannoza *Clivia miniata* (Van Damme et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:825).

(D) Protein gắn kết vitamin, như avidin và các chất tương tự avidin là hữu ích làm thuốc diệt ấu trùng chống lại côn trùng gây hại. Xem US 5,659,026.

(E) Chất ức chế enzym, ví dụ, chất ức chế proteaza hoặc chất ức chế amylaza. Ví dụ về các gen này bao gồm chất ức chế xystein proteinaza ở lúa (Abe et al., 1987 J. Biol. Chem. 262:16793), chất ức chế proteinaza I ở thuốc lá (Huub et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:985), và chất ức chế α -amylaza (Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243).

(F) Hormon hoặc pheromon đặc hiệu côn trùng như ecdysteroit và hormon vị thành niên, biến thể của nó, chất bất chức dựa trên đó, hoặc chất đối kháng hoặc chất chủ vận của nó, như sự biểu hiện baculovirut của esteraza hormon vị thành niên tách dòng, chất bất hoạt của hormon vị thành niên (Hammock et al., 1990 Nature 344:458).

(G) Peptit hoặc peptit thần kinh đặc hiệu côn trùng, khi biểu hiện, phá vỡ quá trình sinh lý của vật gây hại bị ảnh hưởng (J. Biol. Chem. 269:9). Ví dụ về các gen này bao gồm thụ thể hormon lợi tiểu của côn trùng (Regan, 1994), allostatin được xác định trong *Diploptera punctata* (Pratt, 1989), và các độc tố thần kinh gây liệt đặc hiệu côn trùng (US 5,266,361).

(H) Nọc độc đặc hiệu côn trùng được tạo ra tự nhiên bởi rắn, ong vò vẽ, v.v., như peptit gây độc cho côn trùng của bộ cạp (Pang, 1992 Gene 116:165).

(I) Enzym có nhiệm vụ tăng hấp thụ thuộc loại monotерpen, sesquiterpen, steroid, axit hydroxamic, dẫn xuất phenylpropanoit hoặc một phân tử không phải protein khác có hoạt tính trừ sâu.

(J) Enzym tham gia trong việc cải biến, bao gồm sự cải biến sau dịch mã, của phân tử có hoạt tính sinh học; ví dụ, enzym thủy phân glucoza, enzym phân hủy protein, enzym phân hủy lipid, nucleaza, cyclaza, transaminaza, esteraza, hydrolaza, phosphataza, kinaza, phosphorylaza, polymeraza, elastaza, chitinaza và glucanaza, tự nhiên hoặc tổng hợp. Ví dụ về các gen này bao gồm, gen callas (đơn PCT số công bố WO93/02197), trình tự mã hóa chitinaza (có thể thu được, ví dụ, từ ATCC với các số lưu giữ 3999637 và 67152), chitinaza sâu thuốc lá (Kramer et al., 1993 Insect Molec. Biol. 23:691), và gen ubi4-2 polyubiquitin cây mùi tây (Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:673).

(K) Phân tử kích thích sự tải nạp tín hiệu. Ví dụ về các phân tử này bao gồm các trình tự nucleotit của dòng vô tính cADN calmodulin đậu xanh (Botella et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:757) và trình tự nucleotit của dòng vô tính cADN calmodulin cây ngô (Griess et al., 1994 Plant Physiol. 104:1467).

(L) Peptit có mômen kỵ nước. Xem US 5,659,026 và US 5,607,914; patent thứ hai chỉ ra các peptit kháng vi sinh vật tổng hợp truyền tính kháng bệnh.

(M) Permeaza màng, chất tạo kênh hoặc chất phong bế kênh, như chất tương tự cecropin- β lytic peptit (Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89:43) làm cho cây thuốc lá chuyển gen kháng *Pseudomonas solanacearum*.

(N) Protein xâm lấn bởi virus hoặc phức hợp độc tố có nguồn gốc từ đó. Ví dụ, sự tích tụ của các protein vỏ của virus trong các tế bào thực vật biến nạp truyền tính kháng đối với việc nhiễm virus và/hoặc đối với sự phát triển bệnh gây ra do virus mà từ đó gen của protein vỏ được dẫn xuất, cũng như do các virus liên quan. Tính kháng qua trung gian protein vỏ đã được tạo ra khi thực vật được biến nạp chống lại virus gây bệnh khảm ở cỏ linh lăng, virus gây bệnh khảm ở cây dưa chuột, virus gây bệnh sọc thuốc lá, virus X ở khoai tây, virus Y ở khoai tây, virus gây bệnh kỵ axit thuốc lá, virus

gây bệnh nõ lá thuốc lá và virus gây bệnh khảm thuốc lá. Xem, ví dụ, Beachy et al. (1990) *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451.

(O) Kháng thể đặc hiệu côn trùng hoặc độc tố miễn dịch có nguồn gốc từ đó. Do đó, kháng thể được hướng đích chức năng chuyển hóa có tính quyết định trong ruột côn trùng sẽ làm bất hoạt enzym bị ảnh hưởng, giết chết côn trùng. Ví dụ, Taylor et al. (1994) Abstract #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions thể hiện sự bất hoạt enzym ở cây thuốc lá chuyển gen thông qua việc tạo ra các mảnh kháng thể chuỗi đơn.

(P) Kháng thể đặc hiệu virus. Xem, ví dụ, Tavladoraki et al. (1993) *Nature* 266:469, thể hiện rằng các thực vật chuyển gen biểu hiện các gen của kháng thể tái tổ hợp được bảo vệ khỏi sự tấn công của virus.

(Q) Protein làm ngừng phát triển được tạo ra tự nhiên bởi mầm bệnh hoặc ký sinh trùng. Do đó, endo α -1,4-D polygalacturonaza của nấm tạo thuận lợi cho việc xâm chiếm của nấm và giải phóng chất dinh dưỡng thực vật bằng cách hoà tan thành tế bào thực vật homo- α -1,4-D-galacturonaza (Lamb et al., 1992) *Bio/Technology* 10:1436. Việc tách dòng và mô tả đặc điểm của gen mã hóa protein ức chế endopolygalacturonaza đầu được mô tả bởi Toubart et al. (1992 *Plant J.* 2:367).

(R) Protein làm ngừng phát triển được tạo ra tự nhiên bởi thực vật, như gen bất hoạt ribosom của lúa mạch tạo ra tính kháng bệnh nấm tăng (Longemann et al., 1992). *Bio/Technology* 10:3305.

(S) Sự can thiệp của ARN, trong đó phân tử ARN được sử dụng để ức chế sự biểu hiện của gen đích. Phân tử ARN theo một ví dụ là sợi kép một phần hoặc toàn bộ, kích hoạt đáp ứng im lặng, dẫn đến phân cắt dsARN (ARN sợi kép) thành các ARN can thiệp nhỏ, sau đó chúng được kết hợp vào phức hợp đích phá hủy các mRNA tương đồng. Xem, ví dụ, Fire và các đồng tác giả, US 6,506,559; Graham và các đồng tác giả 6,573,099.

Các gen truyền tính kháng thuốc diệt cỏ

(A) Các gen mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ ức chế điểm tăng trưởng hoặc mô phân sinh, như thuốc diệt cỏ imidazalinon, sulfonanilic hoặc sulfonylure. Các gen được nêu làm ví dụ trong phân loại này mã hóa enzym ALS thể

đột biến (Lee et al., 1988 EMBOJ. 7:1241), còn được gọi là enzym AHAS (Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449).

(B) Một hoặc nhiều gen khác mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với glyphosat bị tác động bởi EPSP syntaza thể đột biến và các gen *aroA*, hoặc thông qua sự bất hoạt chuyển hóa bởi các gen như GAT (glyphosat axetyltransferaza) hoặc GOX (glyphosat oxidaza) và các hợp chất phospho khác như glufosinat (các gen *pat* và *bar*; DSM-2), và axit aryloxyphenoxypropionic và xyclohexandion (các gen mã hóa chất ức chế ACCaza). Xem, ví dụ, US 4,940,835, bộc lộ trình tự nucleotit có dạng EPSP có thể truyền tính kháng glyphosat. Phân tử ADN mã hóa gen *aroA* thể đột biến có thể thu được ở ATCC với số lưu giữ 39256, và trình tự nucleotit của gen đột biến được bộc lộ trong US 4,769,061. EP 0 333 033 và US 4,975,374 bộc lộ các trình tự nucleotit của gen glutamin syntetaza truyền tính kháng các thuốc diệt cỏ như L-phosphinothrixin. Trình tự nucleotit của gen phosphinothrixinaxetyl-transferaza được đề xuất trong đơn châu Âu số 0 242 246. De Greef et al. (1989) *Bio/Technology* 7:61 mô tả việc tạo ra các thực vật chuyển gen biểu hiện các gen *bar* thể khả năng mã hóa hoạt tính phosphinothrixin axetyl transferaza. Ví dụ về các gen truyền tính kháng axit aryloxyphenoxypropionic và xyclohexandion, như sethoxydim và haloxyfop, là các gen Accl-S1, Accl-S2 và Accl-S3 được mô tả bởi Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435.

(C) Các gen mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ ức chế sự quang hợp, như triazin (các gen *psbA* và *gs+*) và benzonitril (gen nitrilaza). Przibilla et al. (1991) *Plant Cell* 3:169 mô tả việc sử dụng các plasmit mã hóa gen *psbA* thể đột biến để biến nạp *Chlamydomonas*. Các trình tự nucleotit của gen nitrilaza được bộc lộ trong US 4,810,648, và các phân tử ADN chứa các gen này là có sẵn ở ATCC với các số lưu giữ 53435, 67441 và 67442. Việc tách dòng và biểu hiện của ADN mã hóa glutathion S-transferaza được mô tả bởi Hayes et al. (1992) *Biochem. J.* 285:173.

(D) Các gen mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với thuốc diệt cỏ gắn kết với hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza (HPPD), enzym xúc tác phản ứng trong đó para-hydroxyphenylpyruvat (HPP) được biến đổi thành homogentisat. Các thuốc diệt cỏ này bao gồm isoxazol (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, US 5,424,276), đặc biệt là isoxaflutole, là thuốc diệt cỏ chọn lọc đối với ngô, diketonitril (EP496630, EP496631), đặc biệt là 2-xyano-3-xyclopropyl-1-(2-

SO₂CH₃-4-CF₃ phenyl)propan-1,3-dion và 2-xyano-3-xyclopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂phenyl)propan-1,3-dion, triketon (EP625505, EP625508, US 5,506,195), đặc biệt là sulcotrion, và pyrazolines. Gen sản sinh HPPD nhiều quá mức trong các thực vật có thể tạo ra tính chống chịu hoặc tính kháng các thuốc diệt cỏ như vậy, bao gồm, ví dụ, các gen được mô tả trong US 6,268,549, US 6,245,968 và US 20030066102.

(E) Các gen mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, như axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) và cũng có thể truyền tính kháng hoặc tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ aryloxyphenoxypropionat (AOPP). Ví dụ về các gen này bao gồm gen enzym dioxygenaza phụ thuộc α -ketoglutarat (*aad-1*), được mô tả trong US 7,838,733.

(F) Các gen mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, như axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) và cũng có thể truyền tính kháng hoặc tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ pyridyloxy auxin, như fluroxypyr hoặc triclopyr. Ví dụ về các gen này bao gồm gen enzym dioxygenaza phụ thuộc α -ketoglutarat (*aad-12*), được mô tả trong WO 2007/053482 A2.

(G) Các gen mã hóa tính kháng hoặc tính chống chịu với dicamba (xem, ví dụ, US 20030135879).

(H) Các gen tạo ra tính kháng hoặc tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO) (xem US 5,767,373).

(I) Các gen tạo ra tính kháng hoặc tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ triazin (như atrazin) và các thuốc diệt cỏ dẫn xuất ure (như diuron) gắn kết với các protein lõi của trung tâm phản ứng photosystem II (PS II) (xem Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245).

Các gen truyền hoặc góp phần vào tính trạng tăng giá trị

(A) Sự chuyển hóa axit béo cải biến, ví dụ, bằng cách biến nạp cây ngô hoặc *Brassica* bằng gen đổi mã hoặc stearoyl-ACP desaturaza để làm tăng hàm lượng axit stearic của thực vật này (Knultzon et al., 1992) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624.

(B) Hàm lượng phytat giảm

(1) Việc đưa gen mã hóa phytaza, như gen phytaza của *Aspergillus niger*, vào (Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127:87), làm tăng sự phân hủy phytat, bổ sung thêm phosphat tự do vào thực vật biến nạp.

(2) Gen có thể được đưa vào giúp làm giảm hàm lượng phytat. Ở cây ngô chẳng hạn, điều này có thể được thực hiện bằng cách tách dòng và sau đó đưa lại ADN được kết hợp với alen đơn vào, ADN này gây ra thể đột biến ngô được đặc trưng bởi hàm lượng axit phytic thấp (Raboy et al., 1990 Maydica 35:383).

(C) Chế phẩm hydrat cacbon cải biến được thực hiện, ví dụ, bằng cách biến nạp các thực vật bằng gen mã hóa enzym làm biến đổi kiểu phân nhánh của tinh bột. Ví dụ về các enzym này bao gồm, gen fructosyltransferaza *Streptococcus mucus* (Shiroza et al., 1988) J. Bacteriol. 170:810, gen levansucraza *Bacillus subtilis* (Steinmetz et al., 1985 Mol. Gen. Genel. 200:220), α -amylaza *Bacillus licheniformis* (Pen et al., 1992 Bio/Technology 10:292), gen invertaza cà chua (Elliot et al., 1993), gen amylaza lúa mạch (Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268:22480), và enzym phân nhánh tinh bột nội nhũ ngô II (Fisher et al., 1993 Plant Physiol. 102:10450).

Các thử nghiệm khác nhau có thể được ứng dụng liên quan đến phân tử axit nucleic của một số phương án theo sáng chế. Các kỹ thuật sau là hữu ích trong nhiều trường hợp, và theo một phương án, là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của phân tử axit nucleic và/hoặc polypeptit được mã hóa trong tế bào thực vật. Ví dụ, sự có mặt của phân tử này có thể được xác định theo nhiều cách, bao gồm sử dụng đoạn môi hoặc đoạn dò của trình tự, thử nghiệm ELISA để phát hiện protein được mã hóa, thẩm tách Western để phát hiện protein, hoặc thẩm tách Northern hoặc thẩm tách Southern để phát hiện ARN hoặc ADN. Các thử nghiệm enzym để phát hiện enzym DGT-28 có thể được dùng. Ngoài ra, kháng thể có thể phát hiện sự có mặt của protein DGT-28 có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình được chấp nhận trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật khác, như tạo thể lai *in situ*, nhuộm enzym, và nhuộm miễn dịch, cũng có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc sự biểu hiện của cấu trúc tái tổ hợp trong cơ quan và mô thực vật cụ thể. Gen chuyển có thể được biểu hiện một cách chọn lọc trong một số mô của thực vật hoặc ở một số giai đoạn phát triển, hoặc gen chuyển này có thể được biểu hiện trong hầu hết các mô thực vật, trong gần như toàn bộ vòng đời của nó. Tuy nhiên, trạng thái biểu hiện tổ hợp bất kì cũng có thể áp dụng được.

Phân tích thẩm tách Southern là phương pháp phát hiện được sử dụng phổ biến, trong đó ADN được cắt bằng endonucleaza giới hạn và được tách chiết trên gel agarosa để tách ADN theo trọng lượng phân tử và sau đó chuyển sang màng nilon. Sau đó, ADN này được lai với mảnh đoạn dò đã được đánh dấu phóng xạ bằng ^{32}P (hoặc các gen đánh dấu đoạn dò khác) và rửa trong dung dịch SDS.

Tương tự như vậy, phân tích thẩm tách Northern triển khai quy trình tương tự, trong đó ARN được cắt bằng endonucleaza giới hạn và được tách chiết trên gel agarosa để tách ARN theo trọng lượng phân tử và sau đó chuyển sang màng nilon. Sau đó, ADN này được lai với mảnh đoạn dò đã được đánh dấu phóng xạ bằng ^{32}P (hoặc các gen đánh dấu đoạn dò khác) và rửa trong dung dịch SDS. Việc phân tích ARN (ví dụ, mARN) được tách khỏi mô cần quan tâm có thể cho thấy mức độ biểu hiện tương đối. Thông thường, nếu mARN có mặt hoặc lượng mARN tăng lên, có thể cho rằng rằng gen chuyển tương ứng đang được biểu hiện. Phân tích thẩm tách Northern, hoặc các quy trình phân tích mARN khác, có thể được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện của gen chuyển được đưa vào hoặc gen nguyên thể.

Trong phân tích thẩm tách Western, thay vì tách ADN/ARN, protein cần quan tâm được chiết tách và đưa lên gen acrylamit. Sau đó, protein này được thấm lên trên màng và được cho tiếp xúc với gen đánh dấu. Xem, ví dụ, Hood et al., “Commercial Production of Avidin from Transgenic Maize; Characterization of Transformants, Production, Processing, Extraction and Purification” *Molecular Breeding* 3:291-306 (1997); Towbin et al. (1979) “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications” *Proc Natl Acad Sci USA* 76(9): 4350-4354; Renart et al. “Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure” *Proc Natl Acad Sci USA* 76(7): 3116-3120.

Trong bản mô tả này, các axit nucleic hoặc các đoạn của chúng, có thể được sử dụng để thiết kế các đoạn mồi để khuếch đại PCR. Trong việc thực hiện khuếch đại PCR, một mức độ không khớp nhất định có thể được cho phép giữa đoạn mồi và khuôn mẫu. Sự đột biến, cài xen, và mất đoạn có thể được tạo ra trong đoạn mồi đã cho bằng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Một ví dụ khác về phương pháp phát hiện là kỹ thuật giải trình tự thể hệ mới pyrosequencing như được mô tả bởi Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). Trong phương pháp này, oligonucleotit được thiết kế chồng lên mối nối giữa ADN hệ gen lân cận và ADN cài xen. Oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng quan tâm (một đoạn mỗi trong trình tự được cài xen và một đoạn mỗi trong trình tự hệ gen bên sườn) và được ủ với sự có mặt của ADN polymeraza, ATP, sulfurylaza, luxiferaza, apyaza, adenosin 5' phosphosulfat và luciferin. dNTP được bổ sung riêng rẽ và sự kết hợp này dẫn đến tín hiệu sáng đo được. Tín hiệu sáng cho thấy sự có mặt của trình tự cài xen gen chuyển/bên sườn do sự khuếch đại, tạo thể lai, và kéo dài một hoặc nhiều bazơ thành công.

Molecular Beacons (hải đăng phân tử) đã được mô tả để sử dụng trong việc phát hiện trình tự. Nói ngắn gọn, đoạn dò oligonucleotit FRET được thiết kế chồng lên mối nối giữa hệ gen bên sườn và ADN cài xen. Cấu trúc duy nhất của đoạn dò FRET dẫn đến nó chứa cấu trúc bậc hai giữ được các gốc huỳnh quang và các gốc dập tắt huỳnh quang ở gần nhau. Đoạn dò FRET và đoạn mồi PCR (một đoạn mồi trong trình tự ADN cài xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bên sườn) được quay vòng với sự có mặt của polymeraza ổn định nhiệt và dNTP. Sau khi khuếch đại PCR thành công, việc lai (các) đoạn dò FRET với trình tự đích dẫn đến loại bỏ cấu trúc bậc hai của đoạn dò và tách trong không gian các gốc huỳnh quang và các gốc dập tắt huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang cho thấy sự có mặt của trình tự hệ gen bên sườn/cài xen gen chuyển do sự khuếch đại và tạo thể lai thành công.

Thử nghiệm đoạn dò thủy giải, cũng được gọi là TAQMAN[®] (Life Technologies, Foster City, Calif.), là phương pháp phát hiện và định lượng sự có mặt của trình tự ADN. Nói ngắn gọn, đoạn dò oligonucleotit FRET được thiết kế với một oligo nằm trong gen chuyển và một oligo trong trình tự hệ gen bên sườn cho việc phát hiện đặc hiệu biến thể gen. Đoạn dò FRET và đoạn mồi PCR (một đoạn mồi trong trình tự ADN cài xen và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen bên sườn) được quay vòng với sự có mặt của polymeraza ổn định nhiệt và dNTP. Việc tạo thể lai của đoạn dò FRET dẫn đến phân cắt và giải phóng gốc huỳnh quang ra khỏi gốc dập tắt huỳnh quang trên đoạn dò FRET. Tín hiệu huỳnh quang cho thấy sự có mặt của trình tự bên sườn/cài xen gen chuyển do sự khuếch đại và tạo thể lai thành công.

Thử nghiệm ELISA hoặc thử nghiệm miễn dịch được liên kết enzym đã được biết từ năm 1971. Nói chung, các kháng nguyên hòa tan trong dung dịch đệm được phủ lên bề mặt chất dẻo. Khi huyết thanh được bổ sung, các kháng thể có thể gắn kết với kháng nguyên này trên pha rắn. Sự có mặt hay không có các kháng thể này có thể được thể hiện khi được tiếp hợp với enzym. Việc bổ sung cơ chất thích hợp sẽ phát hiện lượng thể tiếp hợp được gắn kết, lượng này có thể được định lượng. Thử nghiệm ELISA thông thường là thử nghiệm sử dụng các kháng thể đa dòng kháng (protein) được biotin hóa và thể tiếp hợp phosphatase kiềm. Ví dụ, thử nghiệm ELISA được sử dụng để xác định định lượng hàm lượng lacasa có thể là thử nghiệm kẹp kháng thể, thử nghiệm này dùng các kháng thể đa dòng của thỏ thu được trên thị trường. Kháng thể này được tiếp hợp với các phosphatase kiềm để phát hiện. Theo một ví dụ khác, thử nghiệm ELISA để phát hiện trypsin hoặc trypsinogen sử dụng các kháng thể đa dòng kháng trypsin hoặc kháng trypsinogen được biotin hóa và thể tiếp hợp streptavidin-phosphatase kiềm.

Một số phương án đề cập đến các quy trình lai chéo bằng cách sử dụng thực vật theo một phương án của sáng chế này làm ít nhất một bố mẹ. Ví dụ, các phương án cụ thể đề cập đến thực vật lai F_1 có một hoặc cả hai bố mẹ là thực vật bất kì trong số các thực vật được nêu làm ví dụ trong bản mô tả này. Các phương án khác đề cập đến hạt được tạo ra bởi các thể lai F_1 này. Các phương án khác nữa đề cập đến phương pháp tạo ra hạt lai F_1 bằng cách lai thực vật được nêu làm ví dụ với thực vật khác (ví dụ, bố mẹ nhân giống gần) và thu hạt lai thu được. Các phương án khác đề cập đến thực vật được nêu làm ví dụ là bố mẹ cái hoặc bố mẹ đực. Các đặc tính của thực vật thu được có thể được cải thiện bằng cách xem xét cẩn thận các thực vật bố mẹ.

V. Tính chống chịu glyphosat qua trung gian DGT-28

Các polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 có thể có hoạt tính enzym EPSPS. Do đó, các polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1, các axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1 (ví dụ, SEQ ID NO:2-4), và các axit nucleic lai với axit nucleic có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao có thể được sử dụng trong một số phương án để truyền tính chống chịu glyphosat cho tế bào hoặc sinh vật (ví dụ, tế bào thực vật hoặc thực vật). Việc tạo ra thực vật hoặc tế bào thực vật kháng chế phẩm thuốc diệt cỏ chứa glyphosat có thể hữu ích trong

hiệu ứng dụng, trong đó các tế bào thực vật có tính kháng như vậy có thể chịu được việc tiếp xúc với một lượng vừa đủ glyphosat được sử dụng để phòng trừ ít nhất một số loại cỏ dại trong vùng trồng trọt.

Glyphosat, chế phẩm chứa N-(phosphonometyl) glyxin, là thành phần được sử dụng rộng rãi trong các thuốc diệt cỏ. Glyphosat thường được bào chế dưới dạng muối trong chế phẩm đặc dạng lỏng dạng nước, chế phẩm đặc dạng rắn, nhũ tương hoặc vi nhũ tương. Glyphosat có thể được đưa lên phía trên cùng của thực vật từ khi cây mọc đến các giai đoạn phát triển khác nhau của thực vật.

Các loài thực vật chịu được glyphosat được sử dụng kết hợp với các chế phẩm diệt cỏ chứa glyphosat đã trở thành chương trình chuẩn trong việc quản lý cỏ dại trong trồng trọt ở Hoa Kỳ và khắp thế giới. Ưu điểm chủ yếu đối với các nhà trồng trọt trong việc sử dụng tính trạng chống chịu glyphosat là nó cho phép đưa đơn giản và thuận lợi glyphosat; một thuốc diệt cỏ phổ rộng, dùng sau khi cây mọc, vào để phòng trừ các thực vật và cỏ không mong muốn (tức là “cỏ dại”) với độ an toàn rất cao cho cây trồng và ít phụ thuộc vào việc dùng thuốc diệt cỏ trước khi trồng cây. Các lợi ích khác bao gồm phù hợp tốt hơn với các hệ thống canh tác đất tối thiểu và không cày. Các cây trồng chịu được glyphosat đã mở rộng các lựa chọn để quản lý cỏ dại và làm cho việc thực hiện phòng trừ cỏ dại dễ dàng hơn, ít tốn kém hơn và linh hoạt hơn. Các nhà trồng trọt đã báo cáo là thực hiện ít lần ra cánh đồng để phun thuốc diệt cỏ hơn cũng như thực hiện ít lần cày cấy hơn, giúp bảo tồn nhiên liệu và giảm xói mòn đất. Do đó, các cây trồng chịu được glyphosat làm giảm được các nguy cơ cho môi trường gây ra bởi thuốc diệt cỏ, trong khi đồng thời làm tăng hiệu lực của chất hóa học phòng trừ cỏ dại cần thiết.

Do đó, theo một số phương án trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất việc phòng trừ cỏ dại chọn lọc trong vùng trồng trọt của thực vật chứa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1, axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1, và/hoặc axit nucleic lai với axit nucleic có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao, trong đó thực vật này có tính chống chịu glyphosat tăng so với thực vật thuộc cùng loài mà không bao gồm polypeptit và/hoặc (các) axit nucleic. Theo một số ví dụ, phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm bước đưa một lượng vừa đủ glyphosat diệt cỏ lên tán lá của cây và cỏ dại để phòng trừ sinh trưởng của cỏ dại.

Sáng chế mô tả phương pháp diệt hoặc phòng trừ cỏ dại hoặc thực vật không mong muốn trong vùng trồng trọt có cây trồng (ví dụ, thực vật chứa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1, axit nucleic mã hóa polypeptit có độ đồng nhất ít nhất là 90% so với SEQ ID NO:1, và/hoặc axit nucleic lai với axit nucleic có SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3 trong các điều kiện có độ nghiêm ngặt cao). Theo một số ví dụ, phương pháp này bao gồm bước đưa glyphosat vào cây trồng và/hoặc vùng trồng trọt; ví dụ, đưa một lượng glyphosat lên tán lá của cây trồng, và đồng thời lên cỏ dại mọc ở gần các cây này, trong đó lượng này là đủ để giúp phòng trừ cỏ dại hoặc thực vật không mong muốn, trong khi giữ được cho cây trồng gần như không bị tổn hại.

Chế phẩm chứa glyphosat có thể được đưa vào các thực vật ở mức dùng đủ để thu được các kết quả sinh học mong muốn, ví dụ, phòng trừ sự sinh trưởng của cỏ dại mà không tác động đáng kể đến các cây trồng chịu được glyphosat. Các mức dùng này thường được tính dưới dạng lượng glyphosat trên mỗi đơn vị diện tích được xử lý, ví dụ, gam trên mỗi hecta (g/ha). Các yếu tố cấu thành “tác dụng đáng kể” thay đổi theo các tiêu chuẩn và thực hành của các nhà nghiên cứu, phát triển, đưa ra thị trường và sử dụng chế phẩm, và việc lựa chọn các mức dùng có hiệu quả đáng kể của chế phẩm là nằm trong kỹ năng của các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong một số ví dụ nhất định, lượng chế phẩm glyphosat được đưa vào trên mỗi đơn vị diện tích để thu được mức phòng trừ các loài cỏ dại là 85% khi được đo bởi mức giảm sinh trưởng hoặc tỷ lệ chết được sử dụng để xác định mức dùng. Việc lựa chọn một số mức dùng thuốc diệt cỏ glyphosat đủ để phòng trừ cỏ dại trong vùng trồng trọt là nằm trong kỹ năng của nhà nông học có trình độ thông thường. Các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng sẽ nhận ra rằng các tình trạng của từng thực vật, các điều kiện thời tiết và trồng trọt, cũng như các hoạt chất cụ thể và tỷ lệ trọng lượng của chúng trong chế phẩm, có thể ảnh hưởng đến mức độ hiệu quả diệt cỏ trong ứng dụng cụ thể.

Theo một số phương án, chế phẩm glyphosat dạng nước có thể được đưa vào mô lá của thực vật để diệt hoặc phòng trừ sự sinh trưởng của nhiều thực vật không mong muốn, bao gồm cây cỏ hàng năm và lâu năm và các loài cỏ dại lá rộng, bằng cách đưa chế phẩm glyphosat dạng nước vào mô lá của thực vật này. Lượng glyphosat tương đối có mặt trong chế phẩm diệt cỏ được dự tính (ví dụ, chế phẩm đặc dạng rắn dạng

hạt phân tán, chế phẩm đặc dạng lỏng, chế phẩm dùng ngay, và chế phẩm trộn trong thùng) có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm, ví dụ, loài cỏ dại cần phòng trừ và phương pháp dùng. Tuy nhiên, nói chung nồng độ glyphosat, và tùy ý chất diện hoạt và/hoặc một số chất bổ trợ hoặc chất phụ gia khác (như được mô tả ở đầu đó nữa trong bản mô tả này) được sử dụng trong chế phẩm diệt cỏ là đủ để phòng trừ cỏ dại trong vùng trồng trọt.

Chế phẩm phun diệt cỏ có thể được đưa vào dưới dạng dung dịch nước hoặc chế phẩm phân tán, dù chế phẩm này được sản xuất sẵn sàng để dùng, hoặc thu được từ việc pha loãng thêm chế phẩm glyphosat đặc dạng lỏng hoặc bổ sung nước vào chế phẩm glyphosat đặc dạng rắn dạng hạt phân tán. Tuy nhiên, thuật ngữ “dạng nước,” được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm chế phẩm chứa một lượng nhỏ dung môi không phải nước, miễn là dung môi chiếm ưu thế có mặt là nước. Các chế phẩm phun diệt cỏ có thể được đưa vào tán lá của thực vật cần xử lý bằng phương pháp thích hợp bất kì đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm các kỹ thuật dùng phía trên mặt đất và ở mặt đất (ví dụ, đường ống phun trên mặt đất, bình phun cầm tay, và lau bằng dây (rope-wick)).

Theo một số ví dụ, chế phẩm đặc dạng lỏng được bào chế để chứa glyphosat ở nồng độ ít nhất là 50 gam, ít nhất là 75 gam, hoặc ít nhất là 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690 hoặc 700 gam (đương lượng axit (acid equivalent) hoặc a.e.) trên mỗi lit, hoặc lớn hơn. Khoảng nồng độ glyphosat có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 50 đến 680 gam (a.e.) trên lit (gpl), nằm trong khoảng từ 100 đến 600 gpl, nằm trong khoảng từ 250 đến 600 gpl, và nằm trong khoảng từ 360 đến 540 gpl.

Khi được tính dưới dạng tỉ lệ phần trăm khối lượng dựa trên tổng khối lượng của chế phẩm glyphosat đặc, thì chế phẩm đặc dạng lỏng có thể chứa glyphosat (a.e.) với lượng, ví dụ, ít nhất là 10% khối lượng, ít nhất là 15% khối lượng, và ít nhất là 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, hoặc 68% khối lượng, hoặc nhiều hơn. Khoảng nồng độ glyphosat có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 10% khối lượng đến 70% khối lượng a.e., nằm trong khoảng từ 20% khối

lượng đến 68% khối lượng, hoặc nằm trong khoảng từ 25% khối lượng đến 45% khối lượng.

Nếu glyphosat được đưa vào dưới dạng chế phẩm dùng ngay, thì nồng độ glyphosat có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1% khối lượng đến 3% khối lượng a.e., và nằm trong khoảng từ 1% khối lượng đến 2% khối lượng.

Chế phẩm phun có thể được bào chế để đưa, ví dụ, ít nhất là 1 galông (3,78 lit) của chế phẩm phun trên mỗi mẫu Anh, ít nhất là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, hoặc 20 galông (75,7 lit) trên mỗi mẫu Anh, và nhiều hơn. Thể tích phun của chế phẩm phun có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1 galông (3,78 lit) đến 100 galông (378,5 lit) trên mỗi mẫu Anh, từ 2 galông (7,57 lit) đến 40 galông (151,41 lit) trên mỗi mẫu Anh, và từ 2 galông (7,57 lit) đến 5 galông (18,92 lit) trên mỗi mẫu Anh để dùng phía trên mặt đất, và từ 5 galông (18,92 lit) đến 20 galông (75,7 lit) trên mỗi mẫu Anh để dùng ở mặt đất.

Theo một số ví dụ, chế phẩm đặc dạng lỏng có chứa pha nước trong đó glyphosat có mặt chủ yếu ở dạng muối, và pha không phải nước tùy ý chứa hoạt chất diệt cỏ thứ hai tương đối không tan trong nước, có thể được dùng. Các chế phẩm như vậy có thể bao gồm, ví dụ, nhũ tương (bao gồm vĩ mô nhũ tương và vi nhũ tương, loại nước trong dầu, dầu trong nước và nước trong dầu trong nước), huyền phù, và hỗn nhũ tương. Trong một số trường hợp, pha không phải nước có thể bao gồm thành phần được kết vi nang (ví dụ, thuốc diệt cỏ được kết vi nang). Trong các chế phẩm có pha không phải nước, nồng độ của glyphosat a.e. trong toàn bộ chế phẩm có thể, tuy nhiên, nằm trong khoảng cụ thể được nêu làm ví dụ được nêu trong bản mô tả này đối với chế phẩm đặc dạng nước.

Các dạng muối thích hợp của glyphosat có thể được sử dụng theo chế phẩm bất kì bao gồm, ví dụ, muối kim loại kiềm, chẳng hạn các muối natri và kali, muối amoni, muối đi-amoni như dimetylamoni, muối alkylamin, chẳng hạn các muối dimetylamin và isopropylamin, muối alkanolamin, ví dụ, muối etanolamin, muối alkylsulfoni, ví dụ, muối trimetylsulfoni, muối sulfoxoni, và các hỗn hợp hoặc kết hợp của chúng. Ví dụ về các chế phẩm thương mại của glyphosat bao gồm, mà không giới hạn ở: GLYPHOMAX™, GLYPHOMAX™ XRT, GLYPHOMAX™ PLUS, DURANGO™, ROUNDUP™ ULTRA, ROUNDUP™ ULTRAMAK, ROUNDUP™ CT,

ROUNDUP™ EXTRA, ROUNDUP™ BIOACTIVE, ROUNDUP™ BIOFORCE, RODEO™, POLARIS™, SPARK™, ACCORD™ SP, ACCORD™ XRT, và ACCORD™ CONCENTRATE, tất cả các chế phẩm này chứa glyphosat dưới dạng muối isopropylamoni của nó (IPA); ROUNDUP™ DRY và RIVAL™, chứa glyphosat dưới dạng muối amoni của nó; ROUNDUP™ GEOFORCE, chế phẩm chứa natri glyphosat; TOUCHDOWN™, chế phẩm chứa muối glyphosat trimesium, TOUCHDOWN™ IQ, chế phẩm chứa muối glyphosat điamoni, TOUCHDOWN™ TOTAL IQ, chế phẩm chứa kali glyphosat, và ROUNDUP™ WEATHERMAX, chế phẩm chứa kali glyphosat. Các chế phẩm glyphosat có thể chứa chất an toàn, chất diện hoạt, và/hoặc chất bổ trợ.

Nếu mong muốn, người dùng có thể trộn một hoặc nhiều chất bổ trợ với chế phẩm glyphosat và nước pha loãng khi pha chế phẩm để dùng. Các chất bổ trợ này có thể bao gồm chất diện hoạt và/hoặc muối vô cơ bổ sung (ví dụ, amoni sulfat) nhằm mục đích tăng hơn nữa hiệu lực diệt cỏ.

Nếu mong muốn, người dùng cũng có thể sử dụng các chất an toàn thích hợp trong chế phẩm glyphosat để bảo vệ hơn nữa các thực vật và/hoặc để tăng thêm tính kháng chéo với nhiều thuốc diệt cỏ hơn. Các chất an toàn là các chất hóa học làm giảm tính gây độc thực vật của các thuốc diệt cỏ cho các cây trồng bằng cơ chế sinh lý học hoặc phân tử, mà không làm ảnh hưởng đến hiệu lực phòng trừ cỏ dại. Các chất an toàn thường tác động để làm tăng hệ miễn dịch của thực vật bằng cách hoạt hóa/biểu hiện cP450. Các chất an toàn được nêu làm ví dụ bao gồm, ví dụ và không giới hạn ở: benoxacor, cloquintocet, cyometrinil, dichlormid, dicyclonon, dietholate, fenclorazole, fenclorim, flurazole, fluxofenim, furilazole, isoxadifen, mefenpyr, mephenate, anhydrit naphtalic, và oxabetrinil.

Các chất an toàn có thể được sử dụng để bảo vệ các cây thân cỏ có hạt lớn, ví dụ và không giới hạn ở, cây ngô, cây cao lương hạt, và cây lúa nước, chống lại các thuốc diệt cỏ được kết hợp trước khi gieo hạt hoặc được đưa vào trước khi cây mọc thuộc họ thiocarbamat và cloaxetanilit. Các chất an toàn cũng được phát triển để bảo vệ các cây ngũ cốc mùa đông như cây lúa mì chống lại việc dùng các thuốc diệt cỏ aryloxyphenoxypropionat và sulfonylure sau khi cây mọc. Việc sử dụng các chất an toàn để bảo vệ cây ngô và lúa chống lại các thuốc diệt cỏ sulfonylure, imidazolinon, xyclohexandion, isoxazol, và triketon cũng đã được biết.

Các chất hoạt hóa thực vật (nhóm hợp chất mới bảo vệ thực vật bằng cách hoạt hóa cơ chế bảo vệ của chúng) cũng có thể được sử dụng theo các phương án trong bản mô tả này. Các chất hoạt hóa thực vật được nêu làm ví dụ bao gồm acibenzolar và probenazole.

Các phương án theo sáng chế còn được xác định trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế sau đây. Cần hiểu rằng các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa. Từ bản luận trên đây và các ví dụ này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các đặc tính thiết yếu của sáng chế, và không vượt quá ý tưởng và phạm vi của sáng chế, có thể thực hiện các thay đổi và các cải biến khác nhau của các phương án theo sáng chế để làm cho các phương án này phù hợp với các mục đích sử dụng và các điều kiện khác nhau. Do đó, nhiều cải biến của các phương án theo sáng chế ngoài các cải biến được thể hiện và mô tả trong bản mô tả này sẽ là hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực từ phần mô tả ở trên. Các cải biến này cũng được dự định là nằm trong phạm vi của phần yêu cầu bảo hộ kèm theo. Phần dưới đây được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa và không được dự định làm giới hạn phạm vi của sáng chế này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nguyên liệu và phương pháp

Các phương án theo sáng chế được mô tả thêm trong các ví dụ sau, các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và không được dự định làm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Đột biến axit amin đơn (G96A) ở enzym 5-enolpyruvylshikimat 3-phosphat syntaza (EPSP syntaza) của *Escherichia coli* có thể gây ra tính không miễn cảm với glyphosat (Padgett et al., (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al., (2005); Haghani et al., (2008)). Trong khi đột biến này truyền tính chống chịu với glyphosat, nó cũng được biết là ảnh hưởng bất lợi đến gắn kết của EPSP syntaza với cơ chất tự nhiên của nó, phosphoenolpyruvat (PEP). Thay đổi thu được trong hiệu quả gắn kết với cơ chất có thể làm cho enzym đột biến không thích hợp để tạo ra tính chống chịu *in planta* đối với glyphosat.

Dữ liệu ngân hàng gen NCBI được sàng lọc *in silico* đối với protein EPSP syntaza và các trình tự polynucleotit tự nhiên chứa alanin ở vị trí tương tự trong enzym

EPSP syntaza như vị trí của đột biến G96A được đưa vào trong phiên bản *E. coli* của enzym này (Padgett et al., (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al., (2005); Haghani et al., (2008)).

Một enzym được nhận diện là chứa alanin tự nhiên ở vị trí này là DGT-28 (ngân hàng gen ACC số ZP_06917240.1) từ *Streptomyces sviveus* ATCC29083. Việc khai thác tiếp dữ liệu *in silico* phát hiện ra ba enzym *Streptomyces* duy nhất khác có độ tương đồng lớn hơn so với DGT-28; DGT-31 (ngân hàng gen ACC số YP_004922608.1); DGT-32 (ngân hàng gen ACC số ZP_04696613); và DGT-33 (ngân hàng gen ACC số NC_010572). Mỗi trong số các enzym này chứa alanin tự nhiên ở vị trí tương tự trong enzym EPSP syntaza như vị trí của đột biến G96A được đưa vào trong phiên bản *E. coli* của enzym này. Fig.1.

Do các protein EPSP syntaza từ sinh vật khác nhau có chiều dài khác nhau, nên việc đánh số đột biến đối với phiên bản *E.coli* của enzym EPSP syntaza này không nhất thiết tương ứng với việc đánh số đột biến đối với các enzym EPSP syntaza từ sinh vật khác. Các enzym EPSP syntaza được nhận diện này trước đây chưa được mô tả về vấn đề tính chống chịu glyphosat hoặc ái lực với cơ chất PEP. Ngoài ra, các enzym EPSP syntaza này là nhóm enzym EPSP syntaza mới và không chứa các môtip trình tự bất kì được sử dụng để mô tả đặc điểm các enzym EPSP syntaza đã biết trước đây thuộc nhóm I (các trình tự có nguồn gốc thực vật được mô tả thêm trong US RE39247), nhóm II (các trình tự có nguồn gốc vi khuẩn được mô tả thêm trong US RE39247), và nhóm III (các trình tự có nguồn gốc vi khuẩn được mô tả thêm trong WO 2006/110586).

Các enzym DGT-28, DGT-31, DGT-32, và DGT-33 mới được đặc trưng về tính chống chịu glyphosat và ái lực với cơ chất PEP bằng cách so sánh với các enzym EPSP syntaza nhóm I. Các enzym nhóm I sau: DGT-1 từ *Glycine max*, DGT-3 từ *Brassica napus* (ngân hàng gen ACC số P17688), và DGT-7 từ *Triticum aestivum* (ngân hàng gen ACC số EU977181) được dùng để so sánh. Các enzym EPSP syntaza nhóm I và các biến thể đột biến của chúng được tổng hợp và đánh giá. Đột biến được đưa vào enzym EPSP syntaza của thực vật bao gồm đột biến glyxin thành alanin được tạo ra trong enzym EPSP syntaza ở vị trí tương tự như vị trí của đột biến G96A từ phiên bản *E. coli* của enzym này. Ngoài ra, các đột biến threonin thành isoleuxin và prolin thành serin được đưa vào trong các enzym EPSP syntaza nhóm I này ở các vị trí

tương tự như vị trí của axit amin 97 (T thành I) và axit amin 101 (P thành S) trong EPSP syntaza của *E. coli* như được mô tả trong Funke và các đồng tác giả, (2009).

Fig.1 thể hiện sự bất cặp một phần trình tự của DGT-28, DGT-31, DGT-32, và DGT-33 với các enzym EPSP syntaza khác. Tất cả bốn enzym DGT đều có alanin được bảo toàn ở vị trí axit amin 96 của enzym EPSP syntaza *aroA*. Vị trí của axit amin này được biểu thị bằng dấu sao, và gốc axit amin được gạch dưới.

Fig.2 thể hiện sự bất cặp của các enzym DGT-1, DGT-3, và DGT-7. Vị trí của gốc axit amin được gây đột biến từ glyxin thành alanin được biểu thị bằng dấu sao thứ nhất. Vị trí của gốc axit amin được gây đột biến từ threonine thành isoleuxin được biểu thị bằng dấu sao thứ hai. Vị trí của gốc axit amin thứ ba được gây đột biến từ proline thành serin được biểu thị bằng dấu sao thứ ba. Các đột biến này được đưa vào các phiên bản khác nhau của DGT-1, DGT-3, và DGT-7. Các phiên bản khác nhau (v1, v2, v3... vN) của các gen chứa đột biến được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Ví dụ 2: Sự tối ưu hóa trình tự để biểu hiện ở thực vật và vi khuẩn

Sự tối ưu hóa ở thực vật.

Xu hướng sử dụng codon đối với thực vật hai lá mầm và một lá mầm (cây ngô) được tính dưới dạng tần suất mà ở đó codon đơn được sử dụng so với các codon mã hóa tất cả các axit amin. Bảng 1. Theo cách khác, xu hướng sử dụng codon có thể được tính dưới dạng tần suất mà ở đó codon đơn được sử dụng để mã hóa axit amin cụ thể, so với tất cả các codon khác để mã hóa axit amin đó (các codon đồng nghĩa). Trong thiết kế các vùng mã hóa để biểu hiện ở thực vật, các codon chủ yếu (“lựa chọn thứ nhất”) được ưu tiên bởi thực vật cần được xác định, cũng như các lựa chọn thứ hai, thứ ba, thứ tư, v.v., trong số các codon được ưu tiên khi có nhiều lựa chọn.

Phân tích trình tự mã hóa DGT-28 từ *S. svinceus* phát hiện ra sự có mặt của một số môtip trình tự được cho là gây bất lợi cho sự biểu hiện tối ưu ở thực vật, cũng như thành phần codon không tối ưu để biểu hiện ở các thực vật hai lá mầm và một lá mầm.

Bảng 1. Việc biểu hiện codon đồng nghĩa từ các vùng mã hóa của các gen của thực vật một lá mầm (cây ngô %) và hai lá mầm (thực vật hai lá mầm %) được thể hiện trên các cột D, E, I, và J. Các giá trị đối với các bộ biểu hiện codon có xu hướng cân bằng để thiết kế gen tổng hợp được tối ưu hóa ở thực vật là trên các cột C và H.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Axit amin	Codon	Trung bình trọng số	Cây ngô %	Cây hai lá mầm %	axit amin	Codon	Trung bình trọng số	Cây ngô%	Cây hai lá mầm%
ALA (A) 100	GCA	25,5	18	25	LEU (L) 100	CTA	DNU	8	8
	GCC	35,6	34	27		CTC	34,3	26	19
	GCG	DNU	24	6		CTG	DNU	29	9
	GCT	39,0	24	42		CTT	34,3	17	28
ARG (R) 100	AGA	27,4	15	30		TTA	DNU	5	10
	AGG	31,5	26	25		TTG	31,4	15	26
	CGA	DNU	9	8	LYS (K) 100	AAA	30,6	22	39
	CGC	21,7	24	11		AAG	69,4	78	61
	CGG	DNU	15	4	MET (M)	ATG	100	100	100
	CGT	19,4	11	21	PHE (F) 100	TTC	63,2	71	55
ASN (N) 100	AAC	61,4	68	55	PRO (P) 100	TTT	36,8	29	45
100	AAT	38,6	32	45		CCA	41,4	26	42
ASP (D) 100	GAC	52,6	63	42		CCC	25,3	24	17
100	GAT	47,4	37	58		CCG	DNU	28	9
CYS (C) 100	TGC	61,8	68	56	SER (S) 100	CCT	33,3	22	32
100	TGT	38,2	32	44		AGC	26,0	23	18
END 100	TAA		20	48		AGT	DNU	9	14
100	TAG		21	19		TCA	22,4	16	19
	TGA		59	33		TCC	26,3	23	18
GLN (Q) 100	CAA	48,4	38	59		TCG	DNU	14	6
100	CAG	51,6	62	41	THR (T) 100	TCT	25,4	15	25
GLU (E) 100	GAA	38,8	29	49		ACA	28,0	21	27
100	GAG	61,2	71	51		ACC	39,5	37	30
GLY (G) 101	GGA	28,5	19	38		ACG	DNU	22	8
	GGC	29,0	42	16	TRP (W)	ACT	32,5	20	35
	GGG	16,0	20	12		TGG	100	100	100
	GGT	26,6	20	33	TYR (Y) 100	TAC	65,0	73	57
HIS (H) 100	CAC	54,1	62	46	VAL (V) 100	TAT	35,0	27	43
100	CAT	45,9	38	54		GTA	DNU	8	12
ILE (I) 100	ATA	15,9	14	18		GTC	28,7	32	20
	ATC	47,9	58	37		GTG	38,0	39	29
100	ATT	36,4	28	45		GTT	33,3	21	39

*DNU = không sử dụng

Để xử lý kỹ thuật các gen được tối ưu hóa ở thực vật mã hóa protein DGT-28, các trình tự ADN được thiết kế để mã hóa các trình tự axit amin, sử dụng mã di truyền thừa được thiết lập từ bảng xu hướng sử dụng codon được biên soạn từ các trình tự mã

hóa protein của các thực vật chủ cụ thể. Trong Bảng 1, các cột D và I thể hiện sự phân bố (theo % của việc sử dụng tất cả các codon mã hóa cho axit amin đó) của các codon đồng nghĩa đối với mỗi axit amin, như được tìm thấy trong các vùng mã hóa của thực vật một lá mầm (cây ngô). Các cột E và J thể hiện sự phân bố (theo % của việc sử dụng tất cả các codon mã hóa cho axit amin đó) của các codon đồng nghĩa đối với mỗi axit amin, như được tìm thấy trong các vùng mã hóa của thực vật hai lá mầm. Một số codon đồng nghĩa mã hóa một số axit amin chỉ được tìm thấy hiếm có trong các gen thực vật (ví dụ, CGG). Thông thường, codon được coi là hiếm khi được sử dụng nếu nó có số lần sử dụng bằng khoảng 10% hoặc nhỏ hơn để mã hóa axit amin liên quan trong các gen của loại thực vật đó (được biểu thị bằng DNU trong các cột C và H của Bảng 1). Để làm cân bằng sự phân bố của các lựa chọn codon còn lại để mã hóa axit amin, việc thể hiện theo trung bình trọng số đối với mỗi codon được tính, bằng cách sử dụng công thức:

$$\% \text{ trung bình trọng số của } C1 = 1/(\%C1 + \%C2 + \%C3 + \text{v.v.}) \times \%C1 \times 100, (1)$$

trong đó C1 là codon đang xét, và %C2, %C3, v.v. thể hiện các giá trị trung bình của giá trị % của thực vật hai lá mầm của các codon đồng nghĩa còn lại (giá trị % trung bình đối với các codon liên quan được lấy từ các cột C và H) của Bảng 1.

Giá trị % trung bình trọng số đối với mỗi codon được đưa ra trong các cột C và H của Bảng 1.

Sử dụng quy trình nêu trên, trình tự ADN mới mã hóa cơ bản trình tự axit amin của protein DGT-28 được thiết kế để biểu hiện tối ưu ở thực vật hai lá mầm, bằng cách sử dụng sự phân bố codon cân bằng của các codon được sử dụng thường xuyên được tìm thấy trong các gen của thực vật hai lá mầm. Trình tự ADN thứ hai mã hóa cơ bản trình tự axit amin của protein DGT-28 được thiết kế để biểu hiện tối ưu ở thực vật một lá mầm, bằng cách sử dụng sự phân bố codon cân bằng của các codon được sử dụng thường xuyên được tìm thấy trong các gen của thực vật một lá mầm. Hai trình tự ADN mới khác với trình tự ADN ban đầu mã hóa *dgt-28* ở chỗ thay thế các codon của thực vật (được ưu tiên thứ nhất, được ưu tiên thứ hai, được ưu tiên thứ ba, hoặc được ưu tiên thứ tư) để xác định axit amin thích hợp ở mỗi vị trí trong trình tự axit amin của protein.

Việc thiết kế trình tự ADN được tối ưu hóa ở thực vật được bắt đầu bằng việc dịch mã ngược các trình tự protein của trình tự protein DGT-28 (số truy cập ngân hàng gen ZP_06917240.1). SEQ ID NO:1 được dịch mã ngược bằng cách sử dụng bảng xu hướng sử dụng codon cho thực vật hai lá mầm được cấu trúc từ Bảng 1; các cột E và J. Việc dịch mã ngược thứ hai của SEQ ID NO:1 được hoàn thành bằng cách sử dụng bảng xu hướng sử dụng codon cho thực vật một lá mầm được cấu trúc từ Bảng 1; các cột D và I.

Sau đó, các trình tự dịch mã ngược ban đầu được cải biến bằng cách bù các thay đổi codon (trong khi giữ lại sự biểu hiện codon trung bình trọng số toàn bộ) để loại bỏ hoặc bổ sung các vị trí nhận biết enzym giới hạn, loại bỏ các cấu trúc bậc hai nội chuỗi ổn định cao, và loại bỏ các trình tự khác có thể bất lợi cho các thao tác tách dòng hoặc biểu hiện của gen được xử lý kỹ thuật trong các thực vật. Sau đó, trình tự ADN được phân tích lại các vị trí nhận biết enzym giới hạn có thể được tạo ra bằng cách cải biến. Các vị trí được nhận diện được cải biến tiếp bằng cách thay thế các codon liên quan này bằng các codon được ưu tiên lựa chọn thứ nhất, thứ hai, thứ ba, hoặc thứ tư. Các vị trí khác trong trình tự có thể ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của gen cần quan tâm bao gồm mỗi nối exon:intron (5' hoặc 3'), tín hiệu bổ sung poly A, và tín hiệu kết thúc ARN polymeraza. Các trình tự được cải biến được phân tích tiếp và được cải biến tiếp để làm giảm tần suất của các bộ đôi TA hoặc CG, và làm tăng tần suất của các bộ đôi TG hoặc CT. Ngoài các bộ đôi này, các khối trình tự có nhiều hơn sáu gốc [G+C] hoặc [A+T] liên nhau có thể ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của trình tự này. Do đó, các khối trình tự này cũng được cải biến bằng cách thay thế các codon của lựa chọn thứ nhất hoặc thứ hai, v.v. bằng codon của lựa chọn được ưu tiên khác. Các codon hiếm khi được sử dụng không được bao gồm ở phạm vi rộng trong việc thiết kế gen, chỉ được sử dụng khi cần để làm cho phù hợp các tiêu chuẩn thiết kế khác nhau hơn là thành phần codon, bản thân nó (ví dụ, bổ sung hoặc loại bỏ các vị trí nhận biết enzym giới hạn).

Trình tự polynucleotit *dgt-28 v5* được tối ưu hóa ở thực vật hai lá mầm được thiết kế mới được liệt kê trong SEQ ID NO:2. Trình tự polynucleotit *dgt-28 v6* được tối ưu hóa ở thực vật một lá mầm, được thiết kế mới được liệt kê trong SEQ ID NO:3; trình tự này được cải biến nhỏ bằng cách bao gồm alanin ở vị trí axit amin thứ hai để tạo ra vị trí enzym giới hạn. Trình tự ADN thu được có mức độ đa dạng codon cao hơn,

thành phần bazơ mong muốn, chứa các vị trí nhận biết enzym giới hạn được đặt một cách chiến lược, và không có các trình tự có thể gây cản trở phiên mã của gen, hoặc sự dịch mã của sản phẩm mRNA.

Việc tổng hợp các đoạn ADN chứa SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:3 chứa các trình tự bổ sung, như các điểm kết thúc 6 khung (các codon kết thúc nằm trên tất cả sáu khung đọc được bổ sung vào đầu 3' của trình tự mã hóa), và vị trí cắt giới hạn 5' để tách dòng được thực hiện bởi các nhà cung cấp thương mại (DNA2.0, Menlo Park, CA). Sau đó, phân tử axit nucleic tổng hợp được tách dòng vào các vector biểu hiện và được biến nạp vào các thực vật hoặc vi khuẩn như được mô tả trong các ví dụ dưới đây.

Chiến lược tối ưu hóa về codon tương tự được sử dụng để thiết kế *dgt-1*, *dgt-3 v2* (G173A), *dgt-3 v3* (G173A; P178S), *dgt-3 v4* (T174I; P178S), *dgt-7 v4* (T168I; P172S), *dgt-32 v3*, *dgt-33 v3*, và *dgt-33 v3*. Phiên bản được tối ưu hóa về codon của các gen này được liệt kê lần lượt là SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, và SEQ ID NO:144.

Sự tối ưu hóa ở vi khuẩn

Thiết kế trình tự ADN mới mã hóa protein DGT-28 của SEQ ID NO:1 được tối ưu hóa để biểu hiện trong các tế bào *Escherichia coli*. Việc thiết kế trình tự ADN được tối ưu hóa ở *E. coli* được bắt đầu bằng cách dịch mã ngược trình tự protein của SEQ ID NO:1, bằng cách sử dụng quy trình tối ưu hóa về codon độc quyền từ GeneArt (Regensburg, Germany). Trình tự ban đầu được cải biến bằng cách bù các thay đổi codon (trong khi giữ lại sự biểu hiện trung bình trọng số toàn bộ) để loại bỏ hoặc bổ sung các vị trí nhận biết enzym giới hạn, và loại bỏ các cấu trúc bậc hai nội chuỗi ổn định cao, và các trình tự khác có thể bất lợi cho các thao tác tách dòng hoặc biểu hiện của gen được xử lý kỹ thuật. Ví dụ về trình tự bất lợi nêu trên cần tránh trong vùng mã hóa là trình tự gắn kết ARN ribosom 16S (“trình tự Shine-Dalgarno”) như AGGAGG, trình tự này có thể mã hóa, ví dụ, hai axit amin arginin liền nhau, nhưng cũng có thể có chức năng như tín hiệu khởi đầu dịch mã trong gen (và do đó, không mong muốn). Trình tự ADN *dgt-28* thiên về *E. coli* (*dgt-28 v1*) mã hóa protein của SEQ ID NO:1 được đưa ra là SEQ ID NO:4.

Để tạo thuận lợi cho việc tách dòng và bảo đảm việc khởi đầu dịch mã hiệu quả, trình tự nhận biết enzym giới hạn *NdeI* đầu 5' được đặt phía trước codon mở đầu dịch mã ATG. Cũng để tạo thuận lợi cho việc tách dòng, và để bảo đảm việc kết thúc dịch mã chính xác, các bazơ mã hóa hai codon kết thúc dịch mã TAA và vị trí nhận biết enzym giới hạn *XhoI* được bao gồm ở đầu 3' của vùng mã hóa. Việc tổng hợp mảnh ADN chứa SEQ ID NO: 4 được thực hiện bởi nhà cung cấp thương mại, GeneArt™.

Các chiến lược tương tự nhằm tối ưu hóa về codon ở *E. coli* được sử dụng để thiết kế *dgt-1 v5*, *dgt-1 v6* (G112A), *dgt-1 v7* (G112A; P117S), *dgt-1 v8* (T113I; P117S), *dgt-3 v6* (G105A), *dgt-3 v7* (G105A; P112S), *dgt-3 v8* (T106I; P112S), *dgt-7 v5*, *dgt-7 v6* (G113A), *dgt-7 v7* (G113A; P117S), *dgt-7 v8* (T114I; P117S), *dgt-32 v5*, và *dgt-33 v5*. Các phiên bản trình tự *dgt-1*, *dgt-3*, và *dgt-7* được cải biến bằng cách loại bỏ trình tự hướng đích lục lạp. Phiên bản được tối ưu hóa về codon ở *E. coli* của các gen này được liệt kê lần lượt là SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, và SEQ ID NO:24.

Ví dụ 3: Các vector để biểu hiện các gen chịu được glyphosat ở vi khuẩn

Cấu trúc của vector biểu hiện pET, *dgt-28* để biểu hiện ở *E. coli*

Để thử nghiệm *in vitro*, trình tự gen được tối ưu hóa ở *E. coli dgt-28 v1* (SEQ ID NO:4) được tổng hợp và tách dòng bởi GeneArt™ để tổng hợp và tách dòng. Trình tự gen *dgt-28 v1* tổng hợp được được tách dòng vào vector biểu hiện pET28 thông qua các vị trí cắt giới hạn *Nde I* và *Xho I* được bổ sung. Cấu trúc thu được được đưa nhãn His 6X đầu tận cùng N và được đánh dấu là pDAB100445. Fig.14.

Gây đột biến định hướng vị trí của *dgt-28 v1*

Việc gây đột biến định hướng vị trí được thực hiện trên *dgt-28 v1* để đánh giá vai trò của alanin ở vị trí 84 trong việc tạo ra tính chống chịu với glyphosat. Alanin tự nhiên này được gây đột biến thành glyxin để xác định xem nếu thay đổi này có làm giảm tính chống chịu của enzym với glyphosat hoặc ái lực với PEP không. Gốc axit amin này được chọn, do nó tương ứng với đột biến G96A được đưa vào EPSP syntaza của *E. coli* như được mô tả trên đây.

Bộ kit Quick Change II™ từ Stratagene™ (Santa Clara, CA) được sử dụng để tiến hành gây đột biến. Phản ứng PCR được thiết đặt theo quy trình QuickChange™ bằng cách sử dụng pDAB100445 (*dgt-28 v1*) làm ADN khuôn mẫu. Cấu trúc chứa trình tự gen *dgt-28 v2* được gây đột biến được gọi là pDAB102946 (Fig. 15) và được xác nhận thông qua việc giải trình tự ADN. Các đoạn môi sau được thiết kế để làm kích hoạt axit amin:

DGT28 MutF (SEQ ID NO:25; 5'

gATgTTTATTgCCgTgATggTggAACCAACCgCACgTTTTC)

DGT28 MutR (SEQ ID NO:26; 5'

gAAAACgTgCggTggTTCCACCATCACggCAATAAACATC)

Chu kỳ gây đột biến thứ hai được thực hiện trên *dgt-28 v2* nhằm làm giảm hơn nữa tính chống chịu của nó với glyphosat. Đột biến thứ hai, T172A, được đưa vào *dgt-28 v2* đã được gây đột biến từ trước. Đột biến ngược alanin thành threonin của EPSP syntaza ở vị trí này đã được mô tả trước đây trong Haghani và các đồng tác giả, (2008), trong đó đột biến này dẫn đến tính không miễn cảm với glyphosat. Kết quả cuối cùng là tạo ra thể đột biến A84G, T172A kép được gọi là *dgt-28 v3*. Phản ứng PCR được thiết đặt theo quy trình QuickChange™ bằng cách sử dụng pDAB102946 (*dgt-28 v2*) làm ADN khuôn mẫu. Cấu trúc chứa trình tự gen *dgt-28 v3* được gây đột biến được gọi là pDAB100469 (Fig.16). Các đoạn môi sau được sử dụng để tạo ra đột biến T172A:

DGT28 Mut2F (SEQ ID NO:27; 5' gggTCCgCTggCACgTCAGggTCTgCgTATTCg)

DGT28 Mut2R (SEQ ID NO:28; 5'

CgAATACgCAgACCCTgACgTgCCAgCggACCCAgCAGC)

Cấu trúc bổ sung của vector biểu hiện pET để biểu hiện ở *E. coli*

Để thử nghiệm *in vitro*, các trình tự gen *dgt-1 v5*, *dgt-1 v6*, *dgt-1 v7*, *dgt-1 v8*, *dgt-3 v6*, *dgt-3 v7*, *dgt-3 v8*, *dgt-7 v5*, *dgt-7 v6*, *dgt-7 v7*, *dgt-7 v8*, *dgt-32 v5*, và *dgt-33 v5* được tổng hợp và tách dòng (GeneArt™). Các gen tổng hợp được tách dòng vào vector biểu hiện pET28. Các cấu trúc thu được được đánh dấu là pDAB102028 (FIG. 17) chứa *dgt-1 v5*, pDAB102029 (FIG. 18) chứa *dgt-1 v6*, pDAB102032 (FIG. 19) chứa *dgt-1 v7*, pDAB102034 (FIG. 20) chứa *dgt-1 v8*, pDAB100429 (FIG. 21) chứa *dgt-3 v6*, pDAB100442 (FIG. 22) chứa *dgt-3 v7*, pDAB100430 (FIG. 23) chứa

dgt-3 v8, pDAB102036 (FIG. 24) chứa *dgt-7* v5, pDAB102038 (FIG. 25) chứa *dgt-7* v6, pDAB102040 (FIG. 26) chứa *dgt-7* v7, và pDAB102042 (FIG. 27) chứa *dgt-7* v8.

Tách dòng DGT-32, và DGT-33

Để thử nghiệm *in vitro*, các gen được tối ưu hóa ở thực vật như sau; *dgt-32* v3, và *dgt-33* v3 được khuếch đại lần lượt của các vector kép pDAB107532 (FIG. 11) và pDAB107534 (FIG. 12). Các bộ đoạn mỗi sau được sử dụng:

pMALDGT32F (SEQ ID NO:29; CATATGACCGTTATTGAAATTCCGGG) và

pMALDGT32R (SEQ ID NO:30; GATATCCTATTATTAAACGACCTTCCAG) cho *dgt-32*, và pMALDGT33F (SEQ ID NO:31;

CATATGGGTGCAGTTACCGTTATTGA),

pMALDGT33R (SEQ ID NO:32; GATATCCTATTATTATGCCTGCGGAC) cho *dgt-33*.

Sau đó, các trình tự khuếch đại được tách dòng phụ vào pMAL-c5X sao cho mỗi gen là thể dung hợp trong khung với trình tự mã hóa *malE*. Các cấu trúc biểu hiện cuối cùng là pDAB107713 (FIG. 29) chứa *dgt-32* v3, và pDAB107714 (FIG. 30) chứa *dgt-33* v3.

Ví dụ 4: Thử nghiệm động học enzym sinh hóa in-vitro

Sự biểu hiện quá mức và tinh chế các enzym DGT tái tổ hợp

Các protein DGT tái tổ hợp được biểu hiện quá mức trong các tế bào Rosetta2™ (DE3) (Novagen™, Madison, WI) từ các cấu trúc đã mô tả trên đây. Khuẩn lạc đơn được sử dụng để gây nhiễm 50 ml môi trường nuôi cấy men của LB chứa chloramphenicol (25 µg/ml) và kanamycin (50 µg/ml) được nuôi cấy qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Môi trường nuôi cấy qua đêm được sử dụng để gây nhiễm 1L LB chứa chloramphenicol (25 µg/ml) và kanamycin (50 µg/ml). Môi trường nuôi cấy này được phát triển ở nhiệt độ 37°C đến khi O.D.₆₀₀ = 0,6 sau đó được đưa vào trong bể nước đá trong 10 phút. Sự biểu hiện của các protein đích đạt được bằng cách bổ sung IPTG đến nồng độ cuối bằng 500 µM.

Việc cảm ứng được phép tiếp diễn qua đêm ở nhiệt độ 20°C, tiếp theo thu lại thông qua ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút. Các hạt tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi cần để tinh chế. Tất cả các bước tinh chế được thực

hiện ở nhiệt độ 4°C. Các hạt tế bào từ 1 L môi trường nuôi cấy được tái tạo huyền phù trong 20-30 ml dung dịch đệm A (HEPES 50 mM pH 7,5, KCl 150 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, imidazol 20 mM, và glyxerol 5%). Sau đó, bổ sung hỗn hợp chất ức chế proteaza COMPLETE™ (1 viên/50 ml, Roche, Indianapolis, IN) và lysozym (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) và khuấy huyền phù này trong 20 phút. Việc làm tan tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng Branson™ Sonifier™ 250 (xung 3 x 60 giây) tiếp theo loại bỏ các mảnh tế bào vụn bằng cách ly tâm ở tốc độ 16.000 vòng/phút trong 45 phút.

Các enzym DGT được tinh chế cho đồng nhất theo một bước thông qua sắc ký ái lực kim loại cố định (immobilized metal affinity chromatography - IMAC) bằng cách sử dụng cột thô HisTrap FF 5 ml. Cột này được làm cân bằng trong dung dịch đệm A và mẫu được nạp trong dung dịch đệm giống như vậy. Sau đó, rửa cột bằng 10 lần thể tích cột của dung dịch đệm A, tiếp theo rửa giải trong gradient tuyến tính 0-100% dung dịch đệm B (HEPES 50 mM pH 7,5, KCl 200 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM, imidazol 500 mM, và glyxerol 5%) qua 25 lần thể tích cột. Các phần chứa protein đích, như được xác định bằng phân tích SDS-PAGE, được cô đến 2,5 ml bằng cách sử dụng thiết bị siêu ly tâm Millipore có ngưỡng trọng lượng phân tử 10 kDa (molecular weight cut-off - MWCO). Các enzym DGT đã tinh chế được trao đổi đệm bằng cách sử dụng các cột PD-10 (GE Healthcare) trong HEPES 50 mM pH 7,5, KCl 150 mM, DTT 2 mM, và glyxerol 5% và tiếp đó cô đến ~1 ml. Các mẫu thường được pha loãng ở tỷ lệ 1:50 và phổ UV-khả kiến được ghi lại từ 240 – 700 nm trên máy đo quang phổ UV-khả kiến Cary50™ Bio. Sau đó, hệ số tắt lý thuyết được sử dụng để tính toán nồng độ protein dựa trên hệ số hấp thụ ở 280 nm (ExPASy, Geneva, Switzerland).

Sự biểu hiện và tinh chế các thể dung hợp DGT-32 và DGT-33 tái tổ hợp

Các enzym DGT-32 và DGT-33 được cấu trúc để chứa nhãn dung hợp maltoza nằm ở đầu tận cùng amino của enzym này. Các tế bào *Escherichia coli* được biến nạp bằng pDAB107712 (Fig. 28), pDAB107713, và pDAB107714 được phân lập và xác nhận. Khuẩn lạc đơn của mỗi chủng vi khuẩn được sử dụng để gây nhiễm 50 ml môi trường LB chứa 100 µg/µL carbenicillin và 25 µg/µL chloramphenicol. Môi trường nuôi cấy men được phát triển qua đêm ở nhiệt độ 37°C và sau đó được sử dụng để gây nhiễm 600 ml môi trường LB được bổ sung glucoza 0,2%, carbenicillin 100 µg/µl, và chloramphenicol 25 µg/µl. Môi trường nuôi cấy được phát triển ở nhiệt độ 37°C đến

$OD_{600} = 0,4$, tại thời điểm đó, bổ sung IPTG đến nồng độ cuối bằng $50 \mu\text{M}$ IPTG. Môi trường nuôi cấy được cảm ứng trong 15 giờ ở nhiệt độ 18°C . Ngày tiếp theo, thu môi trường nuôi cấy bằng cách ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 20 phút để tạo hạt các tế bào. Các hạt tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi cần để tinh chế.

Các hạt đông lạnh được tái tạo huyền phù trong 20-30 ml dung dịch đệm A (HEPES 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, glycerol 5%, và DTT 1 mM) và 1 viên nén chứa chất ức chế proteaza (Roche Complete). Ngay khi hạt được hòa tan hoàn toàn, bổ sung lysozym 1 mg/ml và trộn mẫu ở nhiệt độ 4°C trong 15-20 phút. Sau khi ủ với lysozym, mẫu này được chuyển sang ống ly tâm 50 ml và được đặt trên đá. Sau đó, siêu âm mẫu này trong khoảng thời gian 1 phút tiếp theo làm mát trong 4 phút. Bước này được lặp lại thêm hai lần nữa trong tổng số ba chu kì siêu âm. Các mảnh tế bào vụn được loại bỏ bằng cách ly tâm ở 16.500 vòng/phút trong 45 phút và dịch nổi được nạp vào vòng tiêm 50 ml. Dịch tan thô được đưa vào cột amyloza cột, rửa trong 7 lần thể tích cột bằng dung dịch đệm A, và rửa giải trong dung dịch đệm B 100% (dung dịch đệm A và 10 mM maltoza). Protein đích được gộp lại và cô đến 2,5 ml bằng cách sử dụng MWCO centricon 30 kDa. Protein đã tinh chế được trao đổi dung dịch đệm vào HEPES 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM, và glycerol 5% bằng cách sử dụng cột lọc gel PD-10. Các nồng độ protein được xác định thông qua thử nghiệm Bradford bằng cách sử dụng BSA làm chuẩn. Protein tinh khiết được đông lạnh trong nitơ lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C .

Mô tả đặc điểm động học *in vitro* của enzym DGT của thực vật và vi khuẩn

Các hoạt tính enzym của các DGT kiểu dại (wild-type - WT) và đột biến được đo bởi mức sản xuất phosphat vô cơ (P_i) trong quy trình cải biến được mô tả bởi Lanzetta et al. (1979) Anal. Bioch. 100:95-7. Các thử nghiệm được thực hiện trong khuôn dạng đĩa 96 giếng với tổng số $50 \mu\text{L}$ trên máy đọc đĩa Spectra-Max 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Các thử nghiệm diễn hình chứa HEPES 50 mM pH 7,5, KCl 150 mM, DTT 2 mM, và S3P 1 mM. Các nồng độ PEP và glyphosat được thay đổi như được chỉ định. Glyphosat được mua từ Sigma dưới dạng axit tự do và được tái tạo huyền phù trong ddH₂O. Glyphosat được hoà tan bằng cách bổ sung KOH cho đến khi hỗn hợp có độ pH trung tính. Các thử nghiệm được bắt đầu bằng cách bổ sung enzym DGT ở các nồng độ biến đổi trong khoảng từ 0,01-1 μM . Các phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung $235 \mu\text{L}$ hỗn hợp chứa xanh malachite: dung dịch amoni molybdat

với tỷ lệ 3:1. Sau khi hiện màu hoàn toàn (~1 phút), mức độ thay đổi hệ số hấp thụ ở 662 nm được ghi lại và lượng P_i tạo ra được tính từ đường cong chuẩn. Các phản ứng đối chứng không có enzym được sử dụng để hiệu chỉnh đối với hệ số hấp thụ nền. Các nồng độ cao của PEP (> 2 mM) và glyphosat (> 30 mM) đóng góp một lượng đáng kể hệ số hấp thụ nền khi sử dụng phương pháp phát hiện này. Dữ liệu được làm phù hợp với phương trình Michaelis-Menten, phương trình này cho phép xác định K_m và V_{max} (phương trình 3) trong khi IC_{50} được xác định từ phương trình 4, trong đó y là hoạt tính tương đối và s là hệ số Hill. Dữ liệu này được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm GraFit™ phiên bản 5 (Erithacus Software Limited, Horley, U.K.).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s} \quad (4)$$

Giá trị IC_{50} đối với chất ức chế cạnh tranh sẽ thay đổi tùy thuộc vào nồng độ của cơ chất, do đó các giá trị IC_{50} trong Bảng 2 thu được ở 1 mM PEP và ở 60 μ M PEP (ước lượng của các nồng độ PEP trong tế bào ở thực vật). Chỉ các giá trị IC_{50} được đo ở cùng nồng độ PEP là được so sánh (việc xác định K_m đối với DGT-32 và DGT-33 được xác định ở 100 μ M PEP). Ngoài ra, các giá trị IC_{50} của các enzym có tính chống chịu cao không thể được xác định một cách chính xác bằng phương pháp của Lanzetta và do đó, được ước tính dựa trên hoạt tính tương đối.

Động học của các DGT ở thực vật

Hai enzym có các trình tự nguyên thể không được gây đột biến, DGT-1 v5 và DGT-7 v5, được thử nghiệm đầu tiên để thiết lập các thông số cơ bản về tính miễn cảm với glyphosat. Cả hai protein thể hiện các giá trị K_m thấp đối với PEP (~70 μ M) và miễn cảm với glyphosat với các giá trị IC_{50} bằng ~20 μ M (Bảng 2) ở 1 mM PEP. Như quan sát thấy đối với DGT-1 v6, DGT-3 v6, và DGT-7 v6, đột biến điểm đơn từ G thành A cải thiện đáng kể tính chống chịu với glyphosat (các giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 8-21 mM) và còn làm tăng K_m đối với PEP lên ~8 lần. Đột biến kép (GAPS), đối với tất cả các DGT có nguồn gốc thực vật (DGT-1 v7, DGT-3 v7, và DGT-7 v7), cũng làm tăng tính chống chịu với glyphosat, và cũng dẫn đến tăng đáng kể K_m của PEP. Bảng 2. Các thể đột biến TIPS (DGT-1 v8, DGT-3 v8, và DGT-7 v8) chịu được

glyphosat ở các nồng độ trung bình (3-6 mM) nhưng trái lại đối với các thể đột biến GA và GAPS, mức K_m vẫn duy trì gần các nồng độ protein kiểu dại nằm trong khoảng 60-200 μM . Fig.31 thể hiện sự thay đổi về tính chống chịu glyphosat đối với DGT-1 (A) và DGT-7 (B) khi đưa các đột biến đã định vào. Nồng độ PEP được duy trì ở 1 mM đối với các thử nghiệm thu được dữ liệu được thể hiện trên Fig. 31, nồng độ này có vẻ dẫn đến tăng IC_{50} (>80 mM) đối với DGT-7 v8. Các quy trình khác được thực hiện để xác định xem nếu mức PEP thấp hơn có làm thay đổi tính chống chịu tương đối với glyphosat hay không. Mức liên quan về mặt sinh lý của PEP nằm trong khoảng 5 – 60 μM . Với 60 μM PEP, giá trị IC_{50} được giảm đáng kể (3,6 mM), gợi ý việc xác định ban đầu bị ảnh hưởng bởi PEP dư, như được mong đợi từ động học Michaelis-Menten và được lưu ý trong Bảng 2.

Fig.31 thể hiện các giá trị IC_{50} thu được sau khi đưa các đột biến khác nhau vào trong DGT-1 (A) và DGT-7 (B) bằng cách sử dụng PEP 1 mM. Đối với cả hai đường cong IC_{50} A và B, các hình tam giác đặc thể hiện kiểu dại, các vòng tròn đặc thể hiện thể đột biến GA, các ô vuông rỗng thể hiện thể đột biến GAPS, và các ô vuông đặc thể hiện thể đột biến TIPS.

Bảng 2. Các thông số động học ở trạng thái ổn định đối với các enzym DGT. Các giá trị IC_{50} lớn hơn 50 là ước lượng do hạn chế của phương pháp được sử dụng. * IC_{50} đối với glyphosat được xác định ở 100 μM PEP.

		IC_{50} (mM glyphosat)					
		Protein	Phiên bản trình tự	IC_{50} ở 1 mM PEP	IC_{50} ở 60 μM PEP	K_M^{PEP} (μM)	K_{cat} / K_m ($\text{M}^{-1} \text{giây}^{-1}$)
Các enzym thực vật	Đậu tương	DGT-1 v5	Nguyên thể	0,0	0,0	73,0	7,41E+04
		DGT-1 v6	GA	21,1	17,3	608,2	1,34E+04
		DGT-1 v7	GA PS	>80,0	>80,0	1291,2	6,67E+03
		DGT-1 v8	TI PS	13,3	5,9	151,4	1,23E+04
	Canola	DGT-3 v6	GA	15,8	8,7	1073,4	1,39E+04
		DGT-3 v7	GA PS	>50,0	42,0	2728,3	2,28E+03
		DGT-3 v8	TI PS	13,3	4,8	196,8	3,29E+04
	Lúa mì	DGT-7 v5	Nguyên thể	0,0	0,0	75,6	2,15E+05
		DGT-7 v6	GA	8,1	15,1	538,2	1,61E+04

		DGT-7 v7	GA PS	19,7	15,4	1103,2	1,46E+04
		DGT-7 v8	TIPS	>80,0	3,6	60,5	1,36E+04
Các enzym vi khuẩn	DGT-28v1	Nguyên thể	>80,0	>80,0	91,6	1,32E+05	
	DGT-28 v2	AG	>50,0	2,2	161,5	6,86E+04	
	DGT-28 v3	AGTA	>50,0	5,2	27,3	6,01E+02	
	DGT-32	Nguyên thể	--	>50,0*	139,8	1,30E+03	
	DGT-33	Nguyên thể	--	>50,0*	114,2	2,40E+03	

Động học của các DGT vi khuẩn

Trong số các enzym vi khuẩn, DGT-28 v1 có các thông số động học toàn bộ có lợi nhất (các giá trị IC_{50} và k_{cat}/K_m tăng). Enzym này chịu được glyphosat ở nồng độ >80 mM và thể hiện hiệu quả xúc tác bằng $1,32 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ giây}^{-1}$. Đột biến A→G trong DGT-28 v2 làm giảm IC_{50} xuống 2,17 mM (ở 60 μM PEP) và gây tăng nhẹ K_m đối với PEP (161 μM). Enzym thể đột biến này giữ được hiệu quả xúc tác cao được thấy ở DGT-28 v1. Ngay cả với IC_{50} thấp, enzym được gây đột biến này là thích hợp để tạo ra tính chống chịu với glyphosat *in planta* trong một số ứng dụng. Dữ liệu này gợi ý rằng trong nhóm EPSP syntaza mới này, alanin không phải là yếu tố quyết định duy nhất đối với tính chống chịu với glyphosat. Để khảo sát các yếu tố quyết định khả thi khác, một biến thể bổ sung, DGT-28 v3 (thể đột biến kép A84G T172A), được tạo ra. Enzym này thể hiện tính chống chịu với glyphosat thấp với giá trị IC_{50} bằng 5,15 mM (ở 60 μM PEP). Việc giảm IC_{50} đối với DGT-28 v3 được đi kèm bởi mức giảm 200 lần về hiệu quả xúc tác, gợi ý đột biến thứ hai dẫn đến các tác dụng không được dự tính (Bảng 2). Các thể tương đồng DGT-28 v1 có độ đồng nhất cao hơn (độ đồng nhất axit amin ~75%), DGT-32 và DGT-33, có K_m thấp hơn đối với PEP (~114 - 139 μM), tuy nhiên hiệu quả xúc tác thấp hơn 100 lần so với DGT-28 v1. Mức giảm hiệu quả xúc tác này có thể có là do sự dung hợp với protein gắn kết maltoza (maltose binding protein - MBP). Các enzym cũng không miễn cảm với glyphosat, với các giá trị IC_{50} lớn hơn 50 mM. Kết quả của các thử nghiệm *in vitro* này chỉ ra rằng các enzym DGT khác nhau tạo ra tính chống chịu với glyphosat, các enzym DGT này được thử nghiệm *in planta*.

Ví dụ 5: Tách dòng các vector biến nạp ở thực vật

Cấu trúc vector kép ở thực vật

Các phương pháp tách dòng chuẩn được sử dụng trong việc cấu trúc các vector tiếp nhận chứa trình tự polynucleotit của peptit vận chuyển lục lạp được gắn với *dgt-28* dưới dạng thể dung hợp trong khung. Các vector tiếp nhận chứa peptit vận chuyển (TraP) được dung hợp với *dgt-28* được lắp ráp bằng cách sử dụng IN-FUSION™ Advantage Technology (Clontech, Mountain View, CA). Kết quả của việc dung hợp, axit amin thứ nhất, metionin, được loại bỏ khỏi *dgt-28*. Mỗi peptit vận chuyển TraP4 v2 (SEQ ID NO:33), TraP5 v2 (SEQ ID NO:34), TraP8 v2 (SEQ ID NO:35), TraP9 v2 (SEQ ID NO:36), TraP12 v2 (SEQ ID NO:37), và TraP13 v2 (SEQ ID NO:38) được tổng hợp bằng DNA2.0 (Menlo Park, CA) và được dung hợp với mảnh có đầu 5' của *dgt-28*, lên đến và bao gồm vị trí nhận biết endonucleaza giới hạn *AccI* duy nhất.

Các plasmit kép chứa các băng biểu hiện TraP và *dgt-28* khác nhau được điều khiển bởi trình tự khởi động Ubiquitin 10 của *Arabidopsis thaliana* (AtUbi10 v2; Callis, et al., (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493) và nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' của khung đọc mở hai mươi-ba của *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1; US 5,428,147).

Các băng biểu hiện TraP và *dgt-28* đã lắp ráp được xử lý kỹ thuật bằng cách sử dụng GATEWAY® Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA) và được biến nạp vào thực vật thông qua sự biến nạp thực vật qua trung gian *Agrobacterium*. Các endonucleaza giới hạn được mua từ New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) và T4 ADN ligaza (Invitrogen) được sử dụng để nối ADN. Các phản ứng Gateway được thực hiện bằng cách sử dụng hỗn hợp enzym GATEWAY® LR CLONASE® (Invitrogen) để lắp ráp một vector tiếp nhận vào vector đến đơn chứa trình tự khởi động virus gây bệnh khảm gân trên sần của băng chất đánh dấu dễ chọn lọc (CsVMV v2; Verdaguer et al., (1996) *Plant Mol. Biol.*, 31: 1129-1139) – DSM-2 (US 2007/086813) - vùng không được dịch mã 3' của khung đọc mở một của *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6; Huang et al., (1990) *J. Bacteriol.* 172:1814-1822). Việc sản xuất plasmit được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit NUCLEOSPIN® Plasmid (Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) hoặc bộ kit Plasmid Midi (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Các đoạn ADN được phân lập bằng cách sử dụng bộ kit QIAquick™ Gel Extraction (Qiagen) sau khi điện di trên gel agarosa Tris-acetat.

Các khuẩn lạc của tất cả các plasmit được lắp ráp được sàng lọc ban đầu bằng cách phân cắt giới hạn của ADN miniprep. ADN plasmit của các dòng vô tính được chọn được giải trình tự bởi nhà cung cấp giải trình tự thương mại (Eurofins™ MWG Operon, Huntsville, AL). Dữ liệu trình tự được lắp ráp và phân tích bằng cách sử dụng phần mềm SEQUENCHER™ (Gên Codes Corp., Ann Arbor, MI).

Các cấu trúc kép sau biểu hiện các trình tự gen dung hợp TraP:*dgt*-28 khác nhau: pDAB107527 (Fig.3) chứa TraP4 v2:*dgt*-28 v5 (SEQ ID NO:79); pDAB105530 (Fig.4) chứa TraP5 v2: *dgt*-28 v5 (SEQ ID NO:80); pDAB105531 (Fig.5) chứa TraP8 v2: *dgt*-28 v5 (SEQ ID NO:81); PDAB105532 (Fig.6) chứa TraP9 v2: *dgt*-28 v5 (SEQ ID NO:82); pDAB105533 (Fig.7) chứa TraP12 v2: *dgt*-28 v5 (SEQ ID NO:83); và pDAB105534 (Fig.8) chứa TraP13 v2:*dgt*-28 v5 (SEQ ID NO:84). Trình tự *dgt*-28 v5 của pDAB105534 được cải biến trong đó codon thứ nhất (GCA) được đổi thành (GCT).

Cấu trúc vector kép bổ sung ở thực vật

Các phương pháp tách dòng tương tự như các phương pháp được mô tả trên đây được sử dụng để cấu trúc các plasmit kép chứa *dgt*-31, *dgt*-32, *dgt*-33, *dgt*-1, *dgt*-3, và *dgt*-7.

Các gen có nguồn gốc từ vi khuẩn; *dgt*-31, *dgt*-32, và *dgt*-33, được dung hợp với các peptit vận chuyển lục lạp khác với các peptit vận chuyển lục lạp đã được mô tả trên đây. Các peptit vận chuyển lục lạp sau được sử dụng; TraP14 v2 (SEQ ID NO:39), TraP23 v2 (SEQ ID NO:40), TraP24 v2 (SEQ ID NO:41). pDAB107532 (Fig.11) chứa *dgt*-32 v3 được dung hợp với TraP14 v2 (SEQ ID NO:42), pDAB107534 (Fig.12) chứa *dgt*-33 v3 được dung hợp với TraP24 v2 (SEQ ID NO:43), và pDAB 1017533 (Fig.54) chứa *dgt*-31 v3 được dung hợp với TraP23 v2 (SEQ ID NO:143). Các băng biểu hiện *dgt* được điều khiển bằng trình tự khởi động Ubiquitin 10 *Arabidopsis thaliana* (trình tự khởi động AtUbi10 v2) và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' của khung đọc mở hai mươi-ba của *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3' UTR v1). Băng chất đánh dấu dễ chọn lọc DSM-2 chứa trình tự khởi động virus gây bệnh khảm gân trên sần (CsVMV v2) –

DSM-2 – vùng không được dịch mã 3' của khung đọc mở một của *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3' UTR v6) cũng có mặt trong vector kép này.

Các dạng kép khác được cấu trúc trong đó *dgt-31 v3*, *dgt-32 v3*, và *dgt-33 v3* được dung hợp với các trình tự peptit vận chuyển lục lạp được mô tả trên đây. Ví dụ, trình tự TraP8 v2 được dung hợp với *dgt-31 v3*, *dgt-32 v3*, và *dgt-33 v3*, và được tách dòng vào các vector kép như đã mô tả trên đây.

Các vector kép chứa các gen nhóm I (*dgt-1*, *dgt-3*, và *dgt-7*) được cấu trúc. Các vector kép sau được cấu trúc và được biến nạp vào thực vật: pDAB4104 (Fig.9), chứa trình tự *dgt-1 v4* như được mô tả trong US 2011/0124503, được nằm bên sườn bởi trình tự Osmotin *Nicotiana tabacum* như được mô tả trong US 2009/0064376; pDAB102715 (Fig.10); pDAB102716 (Fig.45); pDAB102717 (Fig.46); và pDAB102785 (Fig.13). Các peptit vận chuyển lục lạp TraP khác nhau được dung hợp với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33* không được bổ sung vào các gen nhóm I, do các trình tự có nguồn gốc từ thực vật này có các peptit vận chuyển lục lạp thực vật nguyên thể. Các vector này được mô tả chi tiết hơn trong Bảng 3.

Bảng 3. Mô tả các vector kép chứa gen syntaza EPSP nhóm I (tức là *dgt-1*, *dgt-3*, hoặc *dgt-7*).

Tên	Mô tả	Đột biến EPSPS
pDAB4104	Vector kép RB7 MAR v2 :: trình tự khởi động CsVMV v2 / NtOsm 5' UTR v2 / <i>dgt-1 v4</i> / NtOsm 3' UTR v2 / AtuORF24 3' UTR v2 :: trình tự khởi động AtUbi10 v4 / <i>pat v3</i> / AtuORF1 3'UTR v3	TI PS
pDAB102715	Vector kép trình tự khởi động AtUbi10 v2 / <i>dgt-3 v2</i> / AtuORF23 3'UTR v1 :: trình tự khởi động CsVMV v2 / <i>pat v9</i> / AtuORF1 3'UTR v6	GA
pDAB102716	Vector kép trình tự khởi động AtUbi10 v2 / <i>dgt-3 v3</i> / AtuORF23 3'UTR v1 :: trình tự khởi động CsVMV v2 / <i>pat v9</i> / AtuORF1 3'UTR v6	GA PS
pDAB102717	Vector kép trình tự khởi động AtUbi10 v2 / <i>dgt-3 v4</i> / AtuORF23 3'UTR v1 :: trình tự khởi động CsVMV v2 / <i>pat v9</i> / AtuORF1 3'UTR v6	TI PS
pDAB102785	Vector kép trình tự khởi động AtUbi10 v2 / <i>dgt-7 v4</i> / AtuORF23 3'UTR :: trình tự khởi động CsVMV v2 / <i>DSM-2 v2</i> / AtuORF1 3'UTR v6	TI PS

Ví dụ 6: Biến nạp vào Arabidopsis và chọn lọc

Biến nạp *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis được biến nạp bằng cách sử dụng phương pháp nhúng chìm hoa của Clough and Bent (1998). Khuẩn lạc *Agrobacterium* được chọn chứa một trong số các plasmid kép được mô tả trên đây được sử dụng để gây nhiễm một hoặc nhiều 100 ml môi trường canh nuôi cấy trước YEP chứa spectinomycin (100 mg/l) và kanamycin (50 mg/l). Môi trường nuôi cấy này được ủ qua đêm ở nhiệt độ 28°C kết hợp khuấy liên tục ở tốc độ 225 vòng/phút. Các tế bào được tạo hạt ở tốc độ xấp xỉ 5000 xg (50000 m/giây²) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, và dịch nổi thu được được loại bỏ. Hạt tế bào được tái tạo huyền phù chậm trong 400 ml môi trường nhúng chứa: 5% (khối lượng/thể tích) sucroza, 10 µg/L 6-benzylaminopurin, và 0,04% Silwet™ L-77. Các thực vật khoảng 1 tháng tuổi được nhúng vào môi trường này trong 5-10 phút kết hợp khuấy nhẹ. Các thực vật được đặt nằm xuống và phủ bằng các túi chất dẻo trong suốt hoặc đục trong 2-3 giờ, và sau đó được đặt đứng lên. Các thực vật này được trồng ở nhiệt độ 22°C, với chu kỳ sáng là 16 giờ sáng / 8 giờ tối. Khoảng 4 tuần sau khi nhúng, các hạt được thu hoạch.

Chọn lọc các thực vật biến nạp

Hạt T₁ mới được thu hoạch [chứa các băng biểu hiện *dgt* và *DSM-2*] được để khô trong 7 ngày ở nhiệt độ phòng. Hạt T₁ được gieo trong khay nảy mầm có kích thích 26,5 x 51 cm, mỗi khay nhận phần mẫu 200 mg của hạt T₁ đã được phân tầng (~10.000 hạt) đã được tạo huyền phù trước trong 40 ml dung dịch agarosa 0,1% và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong 2 ngày để đáp ứng yêu cầu ở trạng thái tiềm sinh hoàn toàn và bảo đảm hạt nảy mầm đồng đều.

Sunshine Mix LP5 được phủ bằng chất khoáng bón cây mịn và được tưới bên dưới bằng dung dịch Hoagland cho đến khi ướt, sau đó để cho tiêu nước tự chảy. Mỗi 40 ml phần mẫu của hạt đã phân loại được gieo đều nhau lên chất khoáng bón cây bằng pipet và được phủ bằng chụp ẩm trong 4-5 ngày. Chụp được loại bỏ 1 ngày trước khi chọn lọc thể biến nạp ban đầu bằng cách phun glufosinat sau khi cây mọc (chọn lọc đối với gen *DSM-2* được đồng biến nạp).

Bảy ngày sau khi trồng (days after planting - DAP) và 11 DAP nữa, các thực vật T₁ (lần lượt ở giai đoạn lá mầm và 2-4 lá) được phun bằng dung dịch thuốc diệt cỏ

Liberty 0,2% (200 g ai/l glufosinat, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) ở thể tích phun bằng 10 ml/khay (703 l/ha) bằng cách sử dụng đầu phun khí nén DeVilbiss để phân phối mức hiệu quả là 280 g ai/ha glufosinat mỗi lần. Các thực vật còn sống (các thực vật phát triển tích cực) được nhận diện 4-7 ngày sau lần phun cuối và được cấy riêng rẽ trong các chậu cỡ 3 in (7,62 xentimet) đã được chuẩn bị giá thể (Metro Mix 360). Các thực vật được cấy được trồng trong nhà kính ($22\pm 5^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $50\pm 30\%$, 14 giờ sáng:10 giờ tối, tối thiểu $500\ \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ tự nhiên + sáng bổ sung). Phân tích xác định phân tử được hoàn thành trên các thực vật T_1 còn sống để xác nhận rằng gen có tính chống chịu glyphosat đã được hợp nhất ổn định vào hệ gen của thực vật này.

Xác định phân tử

Sự có mặt của các gen chuyển *dgt-28* và *DSM-2* trong hệ gen của các thực vật *Arabidopsis* đã được biến nạp bằng pDAB107527, pDAB105530, pDAB105531, pDAB105532, pDAB105533, hoặc pDAB105534 được xác định. Sự có mặt của các trình tự polynucleotit này được xác định thông qua thử nghiệm đoạn dò thủy giải, PCR bằng biểu hiện gen (còn được mô tả là PCR đơn vị phiên mã thực vật (plant transcription unit) -- PTU PCR), phân tích thâm tách Southern, và phân tích PCR phiên mã ngược định lượng.

Các thực vật *Arabidopsis* T_1 được sàng lọc ban đầu thông qua thử nghiệm đoạn dò thủy giải, tương tự như TAQMAN™, để xác định sự có mặt của các gen chuyển *DSM-2* và *dgt-28*. Các biến thể gen được sàng lọc thông qua PCR bằng biểu hiện gen để xác định xem băng biểu hiện *dgt* có được hợp nhất hoàn toàn vào hệ gen thực vật mà không cần sắp xếp lại hay không. Dữ liệu thu được từ các nghiên cứu này được sử dụng để xác định số bản sao gen chuyển và nhận diện chọn lọc các biến thể gen *Arabidopsis* để tự thụ phấn và tiến tới tạo ra T_2 . Các thực vật *Arabidopsis* T_2 tiến bộ cũng được sàng lọc thông qua thử nghiệm đoạn dò thủy giải để xác định sự có mặt và để ước lượng số bản sao của các gen *DSM-2* và *dgt* trong nhiễm sắc thể của thực vật. Cuối cùng, thử nghiệm thâm tách Southern được sử dụng để xác định số bản sao ước tính trên một bộ phận thực vật *Arabidopsis* T_1 .

Các thử nghiệm tương tự được sử dụng để xác định sự có mặt của gen chuyển *dgt-1* từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB4101, sự có mặt của gen chuyển *dgt-32* từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB107532, sự có mặt của gen chuyển *dgt-33*

từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB107534, sự có mặt của gen chuyển *dgt-3* từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB102715, sự có mặt của gen chuyển *dgt-3* từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB102716, sự có mặt của gen chuyển *dgt-3* từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB102717, và sự có mặt của gen chuyển *dgt-7* từ các thực vật được biến nạp bằng pDAB102785.

Thử nghiệm đoạn dò thủy giải

Số bản sao được xác định trong các thực vật *Arabidopsis* T₁ và T₂ bằng cách sử dụng thử nghiệm đoạn dò thủy giải được mô tả dưới đây. Các thực vật có số gen chuyển thay đổi được nhận diện và đưa vào các nghiên cứu về tính chống chịu glyphosat sau đây.

Các mẫu mô được gom trong đĩa 96 giếng và được đông khô trong 2 ngày. Việc đâm mô được thực hiện bằng máy nghiền mô KLECO™ và các hạt vonfram (Environ Metal INC., Sweet Home, Oregon). Tiếp theo việc đâm mô, ADN hệ gen được tách ở dạng hiệu suất cao bằng cách sử dụng bộ kit Biosprint™ 96 Plant (Qiagen™, Germantown, MD) theo quy trình được gợi ý của nhà sản xuất. ADN hệ gen được định lượng bằng bộ kit thử nghiệm QUANT-IT™ PICO GREEN DNA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). ADN hệ gen định lượng được điều chỉnh đến khoảng 2 ng/μL để thử nghiệm đoạn dò thủy giải bằng cách sử dụng bộ xử lý chất lỏng tự động hóa BIOROBOT3000™ (Qiagen, Germantown, MD). Việc xác định số bản sao gen chuyển bằng thử nghiệm đoạn dò thủy giải được thực hiện bằng PCR theo thời gian thực bằng cách sử dụng hệ thống LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Các thử nghiệm được thiết kế cho *DSM-2*, *dgt-28* và gen tham chiếu nội, *TAFIII5* (ngân hàng gen ID: NC 003075; Duarte et al., (201) *BMC Evol. Biol.*, 10:61).

Để khuếch đại, hỗn hợp LIGHTCYCLER®480 Probes Master (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) được chuẩn bị ở nồng độ cuối 1X trong hỗn hợp phản ứng đa thành phần thể tích 10 μL chứa 0,1 μM của mỗi đoạn mồi của *DSM-2* và *dgt-28*, 0,4 μM của mỗi đoạn mồi của *TAFIII5* và 0,2 μM của mỗi đoạn dò. Bảng 4. Phản ứng khuếch đại gồm hai bước được thực hiện với sự kéo dài ở nhiệt độ 60°C trong 40 giây với việc thu được huỳnh quang. Tất cả các mẫu được chạy và các giá trị ngưỡng chu kỳ (Cycle threshold - Ct) trung bình được sử dụng để phân tích mỗi mẫu. Phân tích dữ

liệu PCR thời gian thực được thực hiện bằng phần mềm LightCycler™ phiên bản 1.5 sử dụng mô đun định lượng tương đối và dựa trên phương pháp $\Delta\Delta C_t$. Về vấn đề này, mẫu của ADN hệ gen từ thực vật chuẩn một bản sao và thực vật kiểm chứng có 2 bản sao đã biết được bao gồm trong mỗi lần chạy. Các kết quả số bản sao của sàng lọc đoạn dò thủy giải được xác định đối với các thực vật *Arabidopsis* chuyển gen T₁ và T₂.

Bảng 4. Thông tin đoạn mồi và đoạn dò của thử nghiệm đoạn dò thủy giải của *DSM-2*, *dgt-28* và gen tham chiếu nội (*TAFII15*).

Tên đoạn mồi	Trình tự
DSM2A (SEQ ID NO:44)	5' AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (SEQ ID NO:45)	5' CCTCCCTCTTTGACGCC 3'
Đoạn dò DSM2 Cy5 (SEQ ID NO:46)	5' CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
DGT28F (SEQ ID NO:47)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT 3'
DGT28R (SEQ ID NO:48)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
Đoạn dò UPL154	Cat# 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)
Đoạn dò TAFII15-HEX (SEQ ID NO:49)	5' AGAGAAGTTTCGACGGATTTTCGGGC 3'
TAFII15-F (SEQ ID NO:50)	5' GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (SEQ ID NO:51)	5' GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

Xác nhận sự hợp nhất *dgt-28* thông qua phân tích thẩm tách Southern

Phân tích thẩm tách Southern được sử dụng để thiết lập mô hình hợp nhất của mảnh ADN sợi T được cài xen và nhận diện các biến thể gen chứa *dgt-28*. Dữ liệu được tạo ra để biểu diễn sự hợp nhất và trạng thái nguyên vẹn của các đoạn xen gen chuyển trong hệ gen *Arabidopsis*. Dữ liệu thẩm tách Southern được sử dụng để nhận diện sự hợp nhất đơn giản của bản sao nguyên vẹn của ADN sợi T. Phân tích thẩm tách Southern chi tiết được tiến hành bằng cách sử dụng đoạn dò được khuếch đại PCR đặc hiệu với băng biểu hiện gen *dgt-28* bằng . Việc lai đoạn dò với ADN hệ gen đã được phân cắt bằng enzym giới hạn cụ thể nhận diện mảnh ADN hệ gen có khối lượng phân tử cụ thể, mô hình của chúng được sử dụng để nhận diện các biến thể gen chuyển T₁ cài xen đơn giản có chiều dài đầy đủ để thúc đẩy thế hệ tiếp theo.

Các mẫu mô được gom trong các ống hình nón 2 ml (Eppendorf™) và được đông khô trong 2 ngày. Việc dầm mô được thực hiện bằng máy nghiền mô KLECKO™ và các hạt vonfram. Tiếp theo việc dầm mô, ADN hệ gen được tách bằng cách sử dụng

quy trình tách CTAB. ADN hệ gen còn được tinh chế bằng bộ kit Qiagen™ Genomic Tips. ADN hệ gen được định lượng bằng bộ kit thử nghiệm Quant-IT™ Pico Green DNA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). ADN hệ gen định lượng được được điều chỉnh đến nồng độ nhất định 4 µg.

Đối với mỗi mẫu, 4 µg ADN hệ gen được phân cắt triệt để bằng enzym giới hạn *SwaI* (New England Biolabs, Beverley, MA) và ủ ở nhiệt độ 25°C qua đêm, sau đó *NsiI* được bổ sung vào phản ứng này và ủ ở nhiệt độ 37°C trong 6 giờ. ADN đã phân cắt được cô bằng cách kết tủa bằng Quick Precipitation Solution™ (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) theo quy trình được đề nghị của nhà sản xuất. Sau đó, ADN hệ gen được tái tạo huyền phù trong 25 µl nước ở nhiệt độ 65°C trong 1 giờ. Các mẫu được tái tạo huyền phù được nạp lên trên gel agarosa 0,8% được pha trong 1X TAE và được điện di qua đêm ở 1,1 V/cm trong dung dịch đệm 1X TAE. Gel này lần lượt được đem làm biến tính (0,2 M NaOH / 0,6 M NaCl) trong 30 phút, và trung hoà (0,5 M Tris-HCl (pH 7,5) / 1,5 M NaCl) trong 30 phút.

Việc chuyển các đoạn ADN sang màng nylon được thực hiện bằng dung dịch 20 X SSC tạo bắc thụ động qua đêm thông qua gel trên màng chuyển IMMOBILON™ NY+ đã xử lý (Millipore, Billerica, MA) bằng cách sử dụng bắc giấy sắc ký và khăn giấy. Sau khi chuyển, màng được rửa nhanh bằng 2X SSC, được liên kết ngang bằng STRATALINKER™ 1800 (Stratagene, LaJolla, CA), và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 80°C trong 3 giờ.

Các vết được ủ bằng dung dịch tiền tạo thể lai (Perfect Hyb plus, Sigma, St. Louis, MO) trong 1 giờ ở nhiệt độ 65°C trong chai lắc thủy tinh sử dụng tủ ủ tạo thể lai kiểu 400 (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA). Các đoạn dò được điều chế từ mảnh PCR chứa toàn bộ trình tự mã hóa. Amplicon PCR được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAEX™ II và được đánh dấu bằng $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP thông qua bộ kit đánh dấu Random RT Prime IT™ (Stratagene, La Jolla, CA). Các vết được lai qua đêm ở nhiệt độ 65°C bằng đoạn dò biến tính được bổ sung trực tiếp vào dung dịch đệm tạo thể lai đến xấp xỉ 2 triệu số đếm một vết trên mỗi ml. Sau khi lai, các vết lần lượt được rửa ở nhiệt độ 65°C bằng 0,1X SSC / 0,1% SDS trong 40 phút. Cuối cùng, các vết được cho tiếp xúc với màn hiện ảnh phospho lưu trữ và được tạo ảnh bằng hệ hiện ảnh Molecular Dynamics Storm 860™.

Phân tích thẩm tách Southern hoàn thành trong nghiên cứu này được sử dụng để xác định số bản sao và xác nhận rằng các biến thể gen được chọn chứa gen chuyển *dgt-28* trong hệ gen của *Arabidopsis*.

Xác nhận bằng biểu hiện gen *dgt-28* thông qua phân tích PCR

Sự có mặt của băng biểu hiện gen *dgt-28* được chứa trong các biến thể gen của thực vật T₁ được phát hiện bằng phản ứng PCR điểm kết thúc. Các đoạn môi (Bảng 5) đặc hiệu với trình tự khởi động AtUbi10 v2 và các vùng AtuORF23 3'UTR v1 của băng biểu hiện gen *dgt-28* được sử dụng để phát hiện.

Bảng 5. Các đoạn môi oligonucleotit được sử dụng để xác nhận băng biểu hiện gen *dgt-28*.

Tên đoạn môi	Trình tự
Oligo xuôi (SEQ ID NO:52)	5' CTGCAGGTCAACGGATCAGGATAT 3'
Oligo ngược (SEQ ID NO:53)	5' TGGGCTGAATTGAAGACATGCTCC 3'

Các phản ứng PCR cần quy trình quay vòng PCR gồm ba bước chuẩn để khuếch đại băng biểu hiện gen. Tất cả các phản ứng PCR được hoàn thành bằng cách sử dụng các điều kiện PCR như sau: 94°C trong ba phút tiếp theo là 35 chu kỳ gồm 94°C trong ba mươi giây, 60°C trong ba mươi giây, và 72°C trong ba phút. Các phản ứng được hoàn thành bằng cách sử dụng bộ kit PCR EX-TAQ™ (TaKaRa Biotechnology Inc. Otsu, Shiga, Japan) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau chu kỳ cuối, phản ứng này được ủ ở nhiệt độ 72°C trong 10 phút. Điện di trên gel agarosa TAE được sử dụng để xác định kích thước amplicon PCR. Các amplicon PCR có kích thước mong muốn biểu thị sự có mặt của băng biểu hiện gen có chiều dài đầy đủ là có mặt trong hệ gen của biến thể gen *Arabidopsis* chuyển gen.

Xác nhận sự phiên mã tương đối *dgt-28* thông qua phân tích PCR phiên mã ngược định lượng

Các mẫu mô của các thực vật chuyển gen *dgt-28* được gom trong đĩa 96 giếng và được đông lạnh ở nhiệt độ 80°C. Việc đảm mô được thực hiện bằng máy nghiền mô KLECO™ và các hạt vonfram (Environ Metal INC., Sweet Home, Oregon). Tiếp theo việc đảm mô, ARN toàn phần được tách ở dạng hiệu suất cao bằng cách sử dụng bộ kit Qiagen™ Rneasy 96 (Qiagen™, Germantown, MD) theo quy trình được gợi ý của nhà sản xuất bao gồm việc xử lý DnaseI tùy ý trên cột. Tiếp theo sau bước này là xử lý

DnaseI bổ sung (Ambion™, Austin, TX) của ARN toàn phần được rửa giải. Việc tổng hợp cADN được thực hiện bằng cách sử dụng ARN toàn phần làm khuôn mẫu bằng bộ kit High Capacity cDNA Reverse Transcription™ (Applied Biosystems, Austin, TX) theo quy trình được đề nghị của nhà sản xuất với việc bổ sung oligonucleotit, TVN. Việc định lượng sự biểu hiện được hoàn thành bằng thử nghiệm đoạn dò thủy giải và được thực hiện bằng PCR theo thời gian thực bằng cách sử dụng hệ thống LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Các thử nghiệm được thiết kế đối với *dgt-28* và gen tham chiếu nội “protein chưa biết” (số truy cập ngân hàng gen: AT4G24610) bằng cách sử dụng phần mềm thiết kế đoạn dò LIGHTCYCLER® 2.0. Để khuếch đại, LIGHTCYCLER®480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) được điều chế ở nồng độ cuối 1X trong phản ứng một thành phần thể tích 10 µl chứa 0,4 µM của mỗi đoạn dò, và 0,2 µM của mỗi đoạn dò. Bảng 6.

Bảng 6. Các đoạn dò PCR được sử dụng để phân tích PCR phiên mã ngược định lượng của *dgt-28*.

Tên đoạn dò	Trình tự
AT26410LP (SEQ ID NO:54)	5' CGTCCACAAAGCTGAATGTG 3'
AT26410RP (SEQ ID NO:55)	5' CGAAGTCATGGAAGCCACTT3'
UPL146	Cat# 04694325001 (Roche, Indianapolis, IN)
DGT28F (SEQ ID NO:56)	5' CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT3'
DGT28R (SEQ ID NO:57)	5' GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
Đoạn dò UPL154	Cat# 04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)

Phản ứng khuếch đại gồm hai bước được thực hiện với sự kéo dài ở nhiệt độ 60°C trong 40 giây với việc thu được huỳnh quang. Tất cả các mẫu được chạy ba lần và các giá trị ngưỡng chu kỳ (Cycle threshold - Ct) trung bình được sử dụng để phân tích mỗi mẫu. Phản ứng phiên mã ngược âm được chạy đối với mỗi mẫu để bảo đảm rằng không có việc nhiễm gADN. Phân tích dữ liệu PCR thời gian thực được thực hiện dựa trên phương pháp $\Delta\Delta Ct$. Thử nghiệm này được sử dụng để xác định sự biểu hiện tương đối của *dgt-28* trong các biến thể gen *Arabidopsis* chuyển gen được xác định là bán hợp tử và đồng hợp tử. Mức độ phiên mã tương đối của mARN *dgt-28* cao hơn từ 2,5 lần đến 207,5 lần so với đối chứng nội. Dữ liệu này cho thấy rằng các thực vật chuyển gen *dgt-28* chứa băng biểu hiện gen *dgt-28* chức năng, và các thực vật này có khả năng phiên mã gen chuyển *dgt-28*.

Phân tích thẩm tách Western

DGT-28 được phát hiện trong các mẫu lá thu được từ các thực vật *Arabidopsis thaliana* chuyển gen. Dịch chiết thực vật từ thực vật chuyển gen *dgt-28* và mẫu chuẩn protein DGT-28 được ủ bằng dung dịch đệm mẫu LDS NUPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA) chứa DTT ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút và được tách bằng điện di trên gel chế tạo sẵn acrylamit. Sau đó, các protein được chuyển điện lên trên màng nitroxenluloza bằng cách sử dụng quy trình của nhà sản xuất. Sau khi phong bế bằng WESTERNBREEZE® Blocking Mix (Invitrogen), protein DGT-28 được phát hiện bằng kháng huyết thanh kháng DGT-28 tiếp theo bằng phosphatase kiềm kháng thể. Protein phát hiện được làm hiện bằng chất phát quang hóa học BCIP/NBT Western Analysis Reagent (KPL, Gaithersburg, MD). Việc tạo ra protein DGT-28 nguyên vẹn thông qua thẩm tách Western chỉ ra rằng các thực vật chuyển gen *dgt-28* được thử nghiệm biểu hiện protein DGT-28.

Ví dụ 7: Tính chống chịu glyphosat

Thực vật *Arabidopsis* T₁ chuyển gen chứa gen chuyển *dgt-28* được phun bằng glyphosat với các mức khác nhau. Các mức tăng được đưa vào trong nghiên cứu này để xác định mức kháng tương đối (105, 420, 1.680 hoặc 3.360 g ae/ha). Mức dùng glyphosat 1X thông thường sẽ phòng trừ *Arabidopsis* không được biến nạp là 420 g ae/ha. Các chế phẩm glyphosat có bổ sung amoni sulfat được đưa vào các thực vật T₁ bằng máy phun theo đường được điều chỉnh ở 187 l/ha. Các thực vật *Arabidopsis* T₁ được sử dụng trong nghiên cứu này là số bản sao biến đổi đối với gen chuyển *dgt-28*. Các thực vật *Arabidopsis* T₁ *dgt-28* có số bản sao thấp được tự thụ phấn và được sử dụng để sản xuất các thực vật T₂. Bảng 7 thể hiện sự so sánh của các thực vật chuyển gen *dgt-28*, so với gen kháng thuốc diệt cỏ glyphosat, *dgt-1*, và các đối chứng kiểu dại. Bảng 8 thể hiện sự so sánh của *dgt-32*, và *dgt-33* so với gen kháng thuốc diệt cỏ glyphosat, *dgt-1*, và các đối chứng kiểu dại. Bảng 9 thể hiện sự so sánh của các enzym EPSP syntaza mới của vi khuẩn so với các enzym EPSP syntaza nhóm I và đối chứng ở mức glyphosat là 1.680 g ae/ha.

Các kết quả chọn lọc glyphosat của các thực vật *Arabidopsis dgt-28* được biến nạp

Thể biến nạp T₁ *Arabidopsis* đầu tiên được chọn từ cơ sở hạt không được biến nạp bằng cách sử dụng sơ đồ chọn lọc glufosinat. Ba buồng hoặc 30.000 hạt được

phân tích đối với mỗi cấu trúc T₁. Các thực vật T₁ được chọn trên đây được mô tả đặc điểm phân tử và các thực vật điển hình có số bản sao thay đổi sau đó được trồng vào các chậu riêng và được phun bằng glyphosat thương mại với các mức khác nhau như được mô tả ở phần trước. Đáp ứng của các thực vật này được thể hiện theo % tổn thương nhìn thấy được 2 tuần sau khi xử lý (weeks after treatment - WAT). Dữ liệu được thể hiện trong bảng thể hiện các thực vật riêng biểu hiện tổn thương ít hoặc không tổn thương (<20%), tổn thương trung bình (20-40%), hoặc tổn thương nặng (>40%). Số trung bình cộng và độ lệch chuẩn được thể hiện đối với mỗi cấu trúc được sử dụng để biến nạp *Arabidopsis*. Khoảng của đáp ứng riêng cũng được thể hiện ở cột cuối cùng đối với mỗi mức và lần biến nạp. *Arabidopsis* (c.v. Columbia) kiểu dại, không được biến nạp được dùng làm đối chứng miễn cảm với glyphosat.

Mức đáp ứng của thực vật thay đổi. Sự thay đổi này có thể được cho là do thực tế mỗi thực vật thể hiện biến thể gen biến nạp độc lập và do đó số bản sao của gen cần quan tâm thay đổi từ thực vật này sang thực vật khác. Lưu ý rằng một số thực vật chứa gen chuyển không chịu được glyphosat; phân tích kỹ lưỡng để xác định xem các thực vật này có biểu hiện gen chuyển hay không không được hoàn thành. Có thể là sự có mặt của gen chuyển với số bản sao cao trong các thực vật *Arabidopsis* T₁ dẫn đến làm im lặng gen chuyển hoặc các tác dụng biểu sinh khác dẫn đến miễn cảm với glyphosat, mặc dù có mặt gen chuyển *dgt-28*.

Trung bình tổn thương toàn bộ quần thể theo mức độ được biểu thị trong Bảng 9 đối với các mức glyphosat ở 1.680 g ae/ha để thể hiện sự khác biệt đáng kể giữa các thực vật được biến nạp bằng *dgt-3*, *dgt-7*, *dgt-28*, *dgt-32*, và *dgt-33* so với *dgt-1* và đối chứng kiểu dại.

Tính chống chịu được tạo ra bởi các EPSP syntaza mới của vi khuẩn thay đổi tùy thuộc vào enzym cụ thể. DGT-28, DGT-32, và DGT-33 bất ngờ tạo ra tính chống chịu đáng kể với glyphosat. Các gen *dgt* truyền tính kháng thuốc diệt cỏ cho các thực vật *Arabidopsis* T₁ riêng qua tất cả các peptit vận chuyển được thử nghiệm. Như vậy, việc sử dụng các peptit vận chuyển lục lập bổ sung (tức là TraP8 – *dgt-32* hoặc TraP8 – *dgt-33*) sẽ tạo ra sự bảo vệ chống lại glyphosat với mức tổn thương tương tự như được báo cáo trong quá trình xử lý đã nêu.

Bảng 7. Đáp ứng của *Arabidopsis* T₁ được biến nạp bằng *dgt-28* với khoảng mức của glyphosat được dùng sau khi cây mọc, so với quần thể kháng đồng hợp tử *dgt-1* (T₄), và đối chứng không được biến nạp % tổn thương nhìn thấy sau 14 ngày dùng.

pDAB107527: TraP4 v2 -- <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20- 40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	4	0	0	3,8	7,5	0-15
420 g ae/ha glyphosat	2	1	1	28,8	28,1	0-65
1680 g ae/ha glyphosat	0	2	2	55,0	26,8	35-85
3360 g ae/ha glyphosat	0	2	2	43,8	18,0	30-70

pDAB105530: TraP5 v2 -- <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	6	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	2	2	2	39,3	37,4	8-100
420 g ae/ha glyphosat	1	4	1	33,0	26,6	8-85
1680 g ae/ha glyphosat	0	4	2	47,5	27,5	25-85
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	6	76,7	13,7	50-85

pDAB105531: TraP8 v2 -- <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	3	1	0	10,8	10,4	0-25
420 g ae/ha glyphosat	3	0	1	22,8	18,6	8-50
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	5,3	3,8	0-8
3360 g ae/ha glyphosat	0	4	0	29,3	6,8	22-35

pDAB105532: TraP9 v2 -- <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	3	0	1	17,5	28,7	0-60
420 g ae/ha glyphosat	1	1	2	39,5	25,1	18-70

1680 g ae/ha glyphosat	3	0	1		26,3	36,1	5-80
3360 g ae/ha glyphosat	3	0	1		25,8	32,9	8-75

pDAB105533: TraP12 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>	% tổn thương				% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%		Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	4	1	0		10,0	10,0	0-25
420 g ae/ha glyphosat	1	1	3		53,6	34,6	8-85
1680 g ae/ha glyphosat	4	1	0		11,0	8,2	0-20
3360 g ae/ha glyphosat	0	2	3		55,0	25,5	25-80

pDAB105534: TraP13 v2 -- <i>dgt-28 v5</i>	% tổn thương				% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%		Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	4	0	1		14,0	20,6	0-50
420 g ae/ha glyphosat	3	1	1		17,6	19,5	0-50
1680 g ae/ha glyphosat	3	0	2		39,0	47,1	5-100
3360 g ae/ha glyphosat	2	2	1		31,2	22,3	18-70

pDAB4104: <i>dgt-1</i> (đối chứng được biến nạp)	% tổn thương				% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%		Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	0	0	4		80,0	0,0	80
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4		80,0	0,0	80
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4		80,0	0,0	80
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4		81,3	2,5	80-85

Kiểu đại (đối chứng không được biến nạp)	% tổn thương				% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40%		Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	5	0	0		0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	0	0	4		100,0	0,0	100
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4		100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4		100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4		100,0	0,0	100

Bảng 8. Đáp ứng của *Arabidopsis* T₁ được biến nạp bằng *dgt-32*, và *dgt-33* với khoảng mức của glyphosat được dùng sau khi cây mọc, so với quần thể kháng đồng hợp tử *dgt-1* (T₄), và đối chứng không được biến nạp. % tổn thương nhìn thấy được 14 ngày sau khi dùng.

pDAB107532: TraP14 v2 – <i>dgt-32</i> v3	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	2	0	2	30,0	29,4	0-60
1680 g ae/ha glyphosat	3	0	1	17,5	21,8	5-50
3360 g ae/ha glyphosat	0	3	1	35,0	30,0	20-80
pDAB107534: TraP24 v2 -- <i>dgt-33</i> v3	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	2	2	0	21,3	14,9	5-40
420 g ae/ha glyphosat	1	1	2	46,3	30,9	5-70
1680 g ae/ha glyphosat	1	0	3	62,5	38,8	5-90
3360 g ae/ha glyphosat	1	0	3	62,0	36,0	8-80
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (đối chứng được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	0	2	3	42,5	15,0	20-50
420 g ae/ha glyphosat	0	1	2	38,8	11,1	25-50
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	79,0	19,4	50-90
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	50,0	0,0	50
Kiểu dại (đối chứng không được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)

0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha glyphosat	0	0	4	85,0	0,0	85
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100

Bảng 9. Đáp ứng của *Arabidopsis* T₁ được biến nạp bằng *dgt-28*, *dgt-32*, *dgt-33*, *dgt-3*, và *dgt-7* với glyphosat được dùng sau khi cây mọc ở 1.680 g ae/ha, so với quần thể kháng đồng hợp tử *dgt-1* (T₄), và đối chứng không được biến nạp. % tổn thương nhìn thấy được 14 ngày sau khi dùng.

			% tổn thương			% tổn thương		
			<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
Các enzym vi khuẩn	pDAB107527	TraP4 v2 -- <i>dgt-28</i> v5	0	2	2	55,0	26,8	35-85
	pDAB105530	TraP5 v2 – <i>dgt-28</i> v5	0	4	2	47,5	27,5	25-85
	pDAB105531	TraP8 v2 – <i>dgt-28</i> v5	4	0	0	5,3	3,8	0-8
	pDAB105532	TraP9 v2 – <i>dgt-28</i> v5	3	0	1	26,3	36,1	5-80
	pDAB105533	Trap12 v2 – <i>dgt-28</i> v5	4	1	0	11,0	8,2	0-20
	pDAB105534	TraP13 v2 – <i>dgt-28</i> v5	3	0	2	39,0	47,1	5-100
	pDAB107532	TraP14 v2 – <i>dgt-32</i> v3	3	0	1	17,5	21,8	5-50
	pDAB107534	TraP24 v2 -- <i>dgt-33</i> v3	1	0	3	62,5	38,8	5-90
Các enzym nhóm I	pDAB102715	<i>dgt-3</i> v2	4	0	3	42	48	0-100
	pDAB102716	<i>dgt-3</i> v3	2	1	0	14	23	0-40
	pDAB102717	<i>dgt-3</i> v4	3	2	1	28	35	10-100
	pDAB102785	<i>dgt-7</i> v4	0	1	1	45	21	30-60
	pDAB4104	<i>dgt-1</i> (đối chứng được biến nạp)	0	0	4	80,0	0,0	80
	--	Kiểu đại (đối chứng không được biến nạp)	0	0	4	100,0	0,0	100

dgt-28 làm chất đánh dấu để chọn lọc

Việc sử dụng *dgt-28* làm chất đánh dấu dễ chọn lọc đối với chất chọn lọc glyphosat được thử nghiệm bằng các thực vật biến nạp *Arabidopsis* được mô tả trên đây. Khoảng 50 hạt *Arabidopsis* thế hệ T₄ (đồng hợp tử đối với *dgt-28*) được trộn vào khoảng 5.000 hạt kiểu dại (mẫn cảm với glyphosat). Các hạt này được cho nảy mầm và các cây non được phun bằng liều glyphosat chọn lọc. Một số lần xử lý bằng glyphosat được so sánh; mỗi khay thực vật nhận một hoặc hai thời điểm dùng glyphosat theo một trong số các phác đồ xử lý sau: 7 DAP (ngày sau khi trồng), 11 DAP, hoặc 7 tiếp theo là 11 DAP. Vì tất cả các thực vật còn chứa gen kháng glufosinat trong cùng vector biến nạp, các thực vật chứa *dgt-28* được chọn bằng glyphosat có thể được so sánh trực tiếp với các thực vật chứa *DSM-2* hoặc *pat* được chọn bằng glufosinat.

Việc xử lý bằng glyphosat được đưa vào bằng đầu phun DeVilbiss™ như được mô tả ở trên. Các thực vật chuyển gen chứa *dgt-28* được nhận diện là có tính “kháng” hoặc “mẫn cảm” 17 DAP. Việc xử lý bằng 26,25-1680 g ae/ha glyphosat được đưa vào 7 và 11 ngày sau khi trồng (DAP), thể hiện tính chọn lọc hiệu quả đối với các thực vật *Arabidopsis* chuyển gen chứa *dgt-28*. Các thực vật mẫn cảm và kháng được đếm và số lượng các thực vật chịu được glyphosat được tìm thấy là tương quan với số hạt chuyển gen ban đầu chứa gen chuyển *dgt-28* được trồng. Các kết quả này biểu thị rằng *dgt-28* có thể được sử dụng một cách hiệu quả làm chất đánh dấu dễ chọn lọc thay thế đối với quần thể *Arabidopsis* được biến nạp.

Mức di truyền. Các biến thể gen *Arabidopsis* T₁ chuyển gen đã xác nhận được cho tự thụ phấn để sản xuất hạt T₂. Các hạt này là con cháu được thử nghiệm bằng cách đưa thuốc diệt cỏ Ignite™ chứa glufosinat (200 g ae/ha) vào 100 cá thể anh em T₂ ngẫu nhiên. Mỗi thực vật T₂ riêng được trồng vào chậu hình vuông kích thước 7,5 cm trước khi phun (máy phun theo đường ở mức dùng 187 l/ha). Các họ T₁ (các thực vật T₂) được phân ly trong mô hình 3 kháng: 1 mẫn cảm đã biết trước đối với locut đơn được di truyền trội với sự di truyền theo thuyết Mendel như được xác định bằng phân tích khi bình phương ($P > 0,05$). Tỷ lệ phân trăm của các họ T₁ được phân ly với sự di truyền theo thuyết Mendel mong đợi được minh họa trong Bảng 10, và chúng tỏ rằng tính trạng *dgt-28* được truyền thông qua sự di truyền theo thuyết Mendel sang thế hệ T₂. Hạt được gom từ 5 đến 15 cá thể T₂ (hạt T₃). Hai mươi lăm cá thể anh em T₃ từ một trong số 3-4 họ T₂ được chọn ngẫu nhiên là con cháu được thử nghiệm như được

mô tả ở trên. Dữ liệu cho thấy không có sự khác biệt và do đó thể hiện rằng *dgt-28* và *dgt-3* được hợp nhất ổn định trong nhiễm sắc thể và được di truyền theo kiểu Mendel cho ít nhất ba thế hệ.

Bảng 10. Tỷ lệ phần trăm của các họ T₁ (các thực vật T₂) riêng rẽ dưới dạng di truyền theo thuyết Mendel đơn đối với thử nghiệm ở con cháu của 100 thực vật.

Gen quan tâm	Các họ T1 được thử nghiệm riêng rẽ ở 1 locut (%)
<i>dgt-3 v2</i>	64%
<i>dgt-3 v3</i>	60%
<i>dgt-3 v4</i>	80%
<i>dgt-7 v4</i>	63%
TraP5 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP8 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP9 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	100%
TraP12 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	50%
TraP13 v2 – <i>dgt-28 v5</i>	75%
Các thực vật đối chứng chuyển gen <i>yfp</i>	100%

Dữ liệu của *Arabidopsis* T₂

Các thực vật thế hệ thứ hai (T₂) có biến thể gen *Arabidopsis* T₁ được chọn chứa gen chuyển *dgt-28* có số bản sao thấp được mô tả thêm về tính chống chịu glyphosat. Glyphosat được đưa vào như được mô tả trên đây. Đáp ứng của các thực vật này được thể hiện theo % tổn thương nhìn thấy được 2 tuần sau khi xử lý (WAT). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng biểu đồ thống kê của các cá thể biểu hiện tổn thương ít hoặc không tổn thương (<20%), tổn thương trung bình (20-40%), hoặc tổn thương nặng (>40%). Số trung bình cộng và độ lệch chuẩn được thể hiện đối với mỗi cấu trúc được sử dụng để biến nạp *Arabidopsis*. Khoảng của đáp ứng riêng cũng được thể hiện ở cột cuối cùng đối với mỗi mức và lần biến nạp. *Arabidopsis* (cv. Columbia) kiểu dại, không được biến nạp được dùng làm đối chứng miễn cảm với glyphosat. Ở thế hệ T₂, các thực vật bán hợp tử và đồng hợp tử là được dùng để thử nghiệm đối với mỗi biến thể gen, và do đó được bao gồm đối với mỗi mức glyphosat được thử nghiệm. Các thực vật bán hợp tử chứa hai alen khác nhau ở locut so với các thực vật đồng hợp tử chứa hai alen giống nhau ở locut. Tính biến đổi của đáp ứng với glyphosat được mong đợi ở thế hệ T₂ như là kết quả của sự khác biệt về liều lượng gen đối với các thực vật bán hợp tử so

với các thực vật đồng hợp tử. Tính biến đổi về đáp ứng với glyphosat được phản ánh ở độ lệch chuẩn và khoảng của đáp ứng.

Ở thế hệ T_2 , cả hai biến thể gen *dgt-28* có một bản sao và nhiều bản sao được đặc trưng về tính chống chịu glyphosat. Trong biến thể gen, các thực vật có một bản sao thể hiện mức chống chịu với glyphosat tương tự. Dữ liệu đặc trưng đối với biến thể gen T_2 có một bản sao được thể hiện trong Bảng 11. Các biến thể gen chứa *dgt-28* được liên kết với TraP5 v2 không tạo ra tính chống chịu mạnh với glyphosat so với các cấu trúc *dgt-28* chứa các peptit vận chuyển TraP khác. Tuy nhiên, cấu trúc *dgt-28* TraP5 tạo ra tính chống chịu glyphosat ở mức thấp so với đối chứng Columbia không được biến nạp. Có trường hợp khi các biến thể gen được thể hiện là chứa hai hoặc nhiều bản sao của *dgt-28* lại mẫn cảm hơn với các mức glyphosat tăng (số liệu không được chỉ ra). Việc tăng tính mẫn cảm với glyphosat này là tương tự với dữ liệu được mô tả trên đây đối với các thực vật T_1 cũng chứa gen chuyển *dgt-28* với số bản sao cao. Có thể là sự có mặt của gen chuyển với số bản sao cao trong các thực vật *Arabidopsis* dẫn đến làm im lặng gen chuyển hoặc các tác dụng biểu sinh khác dẫn đến mẫn cảm với glyphosat, mặc dù có mặt gen chuyển *dgt-28*.

Các biến thể gen này chứa *dgt-28* được liên kết với TraP5 v2 (pDAB105530), TraP12 v2 (pDAB105533) và TraP13 v2 (pDAB105534).

Ngoài *dgt-28*, các biến thể gen *Arabidopsis* T_2 được biến nạp bằng *dgt-3* được thể hiện trong Bảng 12. Như được mô tả đối với biến thể gen *dgt-28* trong Bảng 11, bảng dữ liệu chứa biến thể gen điển hình là đặc trưng của đáp ứng với glyphosat đối với mỗi cấu trúc. Đối với việc mô tả đặc điểm *dgt-3*, các cấu trúc chứa một PTU (plant transformation unit - đơn vị biến nạp thực vật) có gen *dgt-3* được điều khiển bởi trình tự khởi động AtUbi10 (pDAB102716, FIG.45 và pDAB102715, FIG.10) được so sánh với các cấu trúc có cùng gen chứa 2 PTU của gen này (pDAB102719, FIG.32; pDAB102718, FIG.33). Các cấu trúc chứa 2 PTU sử dụng trình tự khởi động AtUbi10 để điều khiển một bản sao của gen và trình tự khởi động CsVMV để điều khiển bản sao kia. Việc sử dụng PTU kép được phối hợp để so sánh các thực vật chuyển gen *dgt-3* với các thực vật chuyển gen *dgt-28* chứa hai bản sao của gen chuyển. Dữ liệu thể hiện rằng các biến thể gen *dgt-3* T_2 có một bản sao chỉ có một PTU là mẫn cảm với glyphosat hơn so với các biến thể gen *dgt-28* có một bản sao được thử nghiệm, nhưng chống chịu tốt hơn so với đối chứng không được biến nạp. Các họ T_1 chứa 2 PTU của gen *dgt-3* tạo ra tính chống chịu nhìn thấy được với glyphosat ở mức cao hơn so với các cấu trúc có 1 PTU. Trong cả hai trường hợp, các họ T_1 được so sánh với *dgt-1* và

các đối chứng kiểu dại. Dữ liệu của T₂ chứng tỏ rằng *dgt-28* tạo ra tính chống chịu mạnh như các biến thể gen có một bản sao.

Bảng 11. Đáp ứng của các biến thể gen *Arabidopsis* T₂ chứa *dgt-28* riêng được chọn với glyphosat được đưa vào sau khi cây mọc ở các mức thay đổi, so với quần thể kháng đồng hợp tử *dgt-1* (T₄), và đối chứng không được biến nạp. % tổn thương nhìn thấy được 14 ngày sau khi dùng.

pDAB105530: TraP5 v2 - <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
1 bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4	75,0	17,8	50-90
840 g ae/ha glyphosat	0	0	4	80,0	20,0	50-90
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	75,0	10,8	60-85
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	76,3	4,8	70-80

pDAB105531: TraP8 v2 - <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
1 bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,5	1,0	0-2
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	7,5	5,0	5-15
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	7,5	6,5	0-15

pDAB105532: TraP9 v2 - <i>dgt-28</i> v5	% tổn thương			% tổn thương		
1 bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	2,0	4,0	0-8
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	9,0	2,0	8-12
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	7,3	4,6	2-12
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	11,0	1,2	10-12

pDAB105533: TraP12 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	% tổn thương			% tổn thương		
	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
1 bản sao						
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
3360 g ae/ha glyphosat	3	1	0	13,3	7,9	8-25

pDAB105534: TraP13 v2 - <i>dgt-28 v5</i>	% tổn thương			% tổn thương		
	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
1 bản sao						
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	3	1	0	5,0	10,0	0-20
840 g ae/ha glyphosat	3	1	0	5,0	10,0	0-20
1680 g ae/ha glyphosat	2	2	0	10,0	11,5	0-20
3360 g ae/ha glyphosat	2	2	0	15,0	12,2	5-30

Kiểu đại (đối chứng không được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
840 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100

pDAB4104: <i>dgt-1</i> (đối chứng được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
1 bản sao						
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	0	4	0	37,5	2,9	35-40
840 g ae/ha glyphosat	0	0	4	45,0	0,0	45
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	47,5	2,9	45-50
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	50,0	0,0	50

Bảng 12. Đáp ứng của các biến thể gen *Arabidopsis* T₂ được biến nạp bằng *dgt-3* được chọn với glyphosat được đưa vào sau khi cây mọc ở các mức thay đổi. % tổn thương nhìn thấy được 14 ngày sau khi dùng.

pDAB102716: <i>dgt-3</i> v3 (1 PTU)	% tổn thương			% tổn thương		
1 đoạn bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glyphosat	1	1	2	39	25	15-65
840 g ae/ha glyphosat	0	2	2	50	23	30-70
1680 g ae/ha glyphosat	0	1	3	69	19	40-80
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	79	6	70-85
pDAB102719: <i>dgt-3</i> v3 (2 PTU)	% tổn thương			% tổn thương		
1 đoạn bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glyphosat	0	4	0	20	0	20
840 g ae/ha glyphosat	0	3	1	38	5	35-45
1680 g ae/ha glyphosat	3	1	0	15	7	10-25
3360 g ae/ha glyphosat	2	2	0	21	8	15-30
pDAB102715: <i>dgt-3</i> v2 (1 PTU)	% tổn thương			% tổn thương		
1 đoạn bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glyphosat	2	2	0	26	16	10-40
840 g ae/ha glyphosat	0	2	2	55	17	40-70
1680 g ae/ha glyphosat	0	2	2	56	22	35-75
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	65	17	50-80
pDAB102718: <i>dgt-3</i> v2 (2 PTU)	% tổn thương			% tổn thương		
1 đoạn bản sao	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0	0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	5	7	0-15
840 g ae/ha glyphosat	2	2	0	23	10	15-35
1680 g ae/ha glyphosat	3	0	1	20	20	5-50
3360 g ae/ha glyphosat	1	1	2	36	22	15-60

Dữ liệu của *Arabidopsis* T₃

Các thực vật thể hệ thứ ba (T₃) có biến thể gen *Arabidopsis* T₂ được chọn chứa gen chuyển *dgt-28* có số bản sao thấp được mô tả thêm về tính chống chịu glyphosat. Hai mươi lăm thực vật mỗi dòng được chọn bằng glufosinat như được mô tả ở trên và các dòng từ mỗi cấu trúc được thử nghiệm không phân ly đối với gen đánh dấu để chọn lọc. Glyphosat được đưa vào như được mô tả trên đây. Đáp ứng của các thực vật này được thể hiện theo % tổn thương nhìn thấy được 2 tuần sau khi xử lý (WAT). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng biểu đồ thống kê của các cá thể biểu hiện tổn thương ít hoặc không tổn thương (<20%), tổn thương trung bình (20-40%), hoặc tổn thương nặng (>40%). Số trung bình cộng và độ lệch chuẩn được thể hiện đối với mỗi cấu trúc được sử dụng để biến nạp *Arabidopsis*. Khoảng của đáp ứng riêng cũng được thể hiện ở cột cuối cùng đối với mỗi mức và lần biến nạp. *Arabidopsis* (cv. Columbia) kiểu dại, không được biến nạp được dùng làm đối chứng miễn cảm với glyphosat.

Bảng 13. Đáp ứng của các biến thể gen *Arabidopsis* T₃ chứa *dgt-28* riêng được chọn với glyphosat được đưa vào sau khi cây mọc ở các mức thay đổi, so với quần thể kháng đồng hợp tử *dgt-1* (T₄), và đối chứng không được biến nạp. % tổn thương nhìn thấy được 14 ngày sau khi dùng.

<i>dgt-28</i> (pDAB 107602)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4	73,8	2,5	70-75
840 g ae/ha glyphosat	0	0	4	71,3	7,5	60-75
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	77,5	2,9	75-80
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	77,5	2,9	75-80

<i>TraP4::dgt-28</i> (pDAB107527)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	5,0	0,0	5
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	10,0	0,0	10
3360 g ae/ha glyphosat	1	3	0	18,8	2,5	15-20

TraP5 v1:: <i>dgt-28</i> (pDAB102792)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	3	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha glyphosat	3	0	0	0,0	0,0	0
1680 g ae/ha glyphosat	3	0	0	6,0	1,7	5-8
3360 g ae/ha glyphosat	2	0	0	6,5	2,1	5-8

TraP5 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105530)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	6,0	1,7	5-8
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	8,0	0,0	8
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	14,3	1,5	12-15
3360 g ae/ha glyphosat	1	3	0	18,7	2,5	15-20

TraP8 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105531)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	2,5	5,0	0-10
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	3,3	3,9	0-8
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	2,5	2,9	0-5
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	7,3	6,4	2-15

TraP9 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105532)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	1,3	2,5	0-5
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	1,8	2,4	0-5
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	10,0	4,4	5-15

TraP12 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105533)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	3,8	7,5	0-15
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	6,3	4,8	0-10

TraP13 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105534)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	2	2	0	10,0	11,5	0-20
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	2,8	1,5	2-5
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	8,0	0,0	8

TraP23:: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0	7,8	2,1	5-10
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0	10,8	3,0	8-15

Kiểu đại (đối chứng không được biến nạp)	Khoảng % tổn thương (Số bản sao)			Phân tích % tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40%	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
840 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4	100,0	0,0	100

Chọn lọc các thực vật biến nạp

Hạt T₁ mới thu hoạch [gen *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33 v1*] được để khô ở nhiệt độ phòng và được chuyển đến Indianapolis để thử nghiệm. Hạt T₁ được gieo trong khay nảy mầm có kích thước 26,5 x 51 cm (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN), mỗi khay nhận phần mẫu 200 mg của hạt T₁ đã được phân tầng (~10.000 hạt) đã được tạo huyền phù trước trong 40 ml dung dịch agarosa 0,1% và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong 2 ngày để đáp ứng yêu cầu ở trạng thái tiềm sinh hoàn toàn và bảo đảm hạt nảy mầm đồng đều.

Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) được phủ bằng chất khoáng bón cây mịn và được tưới bên dưới bằng dung dịch Hoagland cho đến khi ướt, sau đó để cho tiêu nước tự chảy. Mỗi 40 ml phần mẫu của hạt đã phân loại được gieo đều nhau lên chất khoáng bón cây bằng pipet và được phủ bằng chụp ẩm (KORD™ Products, Bramalea, Ontario, Canada) trong 4-5 ngày. Chụp được loại bỏ ngay khi thực vật đã nảy mầm trước khi chọn lọc thể biến nạp ban đầu bằng cách phun glufosinat sau khi cây mọc (chọn lọc đối với gen *dsm-2* được đồng biến nạp).

Sáu ngày sau khi trồng (DAP) và 10 DAP nữa, các thực vật T₁ (lần lượt ở giai đoạn lá mầm và 2-4 lá) được phun bằng dung dịch thuốc diệt cỏ IGNITE™ 0,1% (280 g ai/l glufosinat, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) ở thể tích phun bằng 10 ml/khay (703 l/ha) bằng cách sử dụng đầu phun khí nén DeVilbiss™ để phân phối mức hiệu quả là 200 g ae/ha glufosinat mỗi lần. Các thực vật còn sống (các thực vật phát triển tích cực) được nhận diện 4-7 ngày sau lần phun cuối. Các thực vật còn sống được cấy riêng rẽ trong các chậu cỡ 3 ½ in (7,62 xentimet) đã được chuẩn bị giá thể (Metro Mix 360™). Các thực vật được trồng trong nhà kính ít nhất 1 ngày trước khi lấy mẫu mô để phân tích số bản sao.

Các thực vật T₁ được lấy mẫu và việc phân tích số bản sao đối với gen *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33 v1* được hoàn thành. Sau đó, các thực vật T₁ được định các mức glyphosat khác nhau sao cho khoảng bản sao là nằm trong mỗi mức dùng. Đối với *Arabidopsis*, 26,25 g ae/ha glyphosat là liều hiệu quả để phân biệt các thực vật miễn cảm với các thực vật khác với mức kháng có nghĩa. Các mức tăng được đưa vào để xác định các mức kháng tương đối (105, 420, 1680, hoặc 3360 g ae/ha). Bảng 15 thể hiện sự so sánh đối với *dgt-1*.

Tất cả các lần dùng thuốc diệt cỏ glyphosat được thực hiện bằng máy phun theo đường ở thể tích phun 187 l/ha. Glyphosat được sử dụng là dạng chế phẩm muối dimetylamin Durango thương mại (480 g ae/l, Dow AgroSciences, LLC). Các thực vật

T₁ có số bản sao thấp biểu hiện tính chống chịu với glufosinat hoặc glyphosat được đánh giá tiếp ở thế hệ T₂.

Việc biến nạp *Arabidopsis* thứ nhất được tiến hành bằng cách sử dụng *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33 v1*. Thể biến nạp T₁ đầu tiên được chọn từ cơ sở hạt không được biến nạp bằng cách sử dụng sơ đồ chọn lọc glufosinat. Ba buồng hoặc 30.000 hạt được phân tích đối với mỗi cấu trúc T₁. Tần suất biến nạp được tính và các kết quả của các cấu trúc *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33* của T₁ được liệt kê trong Bảng 14.

Bảng 14. Tần suất biến nạp của các cấu trúc *Arabidopsis dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33* T₁ được chọn bằng glufosinat để chọn lọc gen đánh dấu để chọn lọc DSM-2.

Cấu trúc	Bảng	Tần suất biến nạp (%)
pDAB107532	AtUbi10/TraP14 <i>dgt-32 v1</i>	0,47
pDAB107533	AtUbi10/TraP23 <i>dgt-31 v1</i>	0,36
pDAB107534	AtUbi10/TraP24 <i>dgt-33 v1</i>	0,68

Các thực vật T₁ được chọn trên đây sau đó được trồng vào các chậu riêng và được phun bằng glyphosat thương mại với các mức khác nhau. Bảng 15 so sánh đáp ứng của *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33 v1* và gen đối chứng truyền tính kháng glyphosat cho các thể biến nạp T₁ *Arabidopsis*. Đáp ứng được thể hiện theo % tổng thương nhìn thấy được 2 WAT. Dữ liệu được thể hiện dưới dạng biểu đồ thống kê của các cá thể biểu hiện tổn thương ít hoặc không tổn thương (<20%), tổn thương trung bình (20-40%), hoặc tổn thương nặng (>40%). Số trung bình cộng và độ lệch chuẩn được thể hiện đối với mỗi lần xử lý. Khoảng của đáp ứng riêng cũng được thể hiện ở cột cuối cùng đối với mỗi mức và lần biến nạp. *Arabidopsis* (cv. Columbia) kiểu dại, không được biến nạp được dùng làm đối chứng miễn cảm với glyphosat. Gen *DGT-31 (v1)* với peptit vận chuyển (TraP23) truyền tính chống chịu thuốc diệt cỏ yếu cho các thực vật *Arabidopsis* T₁ riêng so với đối chứng âm tính, nhưng gen này thể hiện tính chống chịu được cải thiện với peptit vận chuyển TraP8. Cả hai DGT-32 và DGT-33 thể hiện tính chống chịu mạnh với glyphosat ở các mức được thử nghiệm với TraP8 và với peptit vận chuyển lục lạp khác nhau tương ứng của chúng (lần lượt là TraP14 và TraP24). Trong quá trình xử lý đã nêu, mức đáp ứng của thực vật thay đổi lớn, có thể được cho là do thực tế mỗi thực vật thể hiện biến thể gen biến nạp độc lập và do đó số bản sao của gen cần quan tâm thay đổi từ thực vật này sang thực vật khác. Lưu ý quan trọng là ở mỗi mức glyphosat được thử nghiệm, có các cá thể có tính chống chịu tốt

hơn so với các cá thể khác. Trung bình tổn thương toàn bộ quần thể theo mức độ được biểu thị trong Bảng 15 để thể hiện sự khác biệt đáng kể giữa các thực vật được biến nạp bằng *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33* v1 so với *dgt-1* v1 hoặc đối chứng kiểu dại.

Bảng 15. Đáp ứng của *Arabidopsis* T₁ được biến nạp bằng *dgt-31*, *dgt-32*, và *dgt-33* v1 với khoảng mức của glyphosat được đưa vào sau khi cây mọc, so với quần thể kháng đồng hợp tử *dgt-1* (T4), hoặc đối chứng không được biến nạp. % tổn thương nhìn thấy được 2 tuần sau khi xử lý.

TraP23 <i>dgt-31</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81,3	2,5	80-85
420 g ae/ha	0	0	4	97,3	4,9	90-100
1680 g ae/ha	0	0	4	90,0	7,1	85-100
3360 g ae/ha	0	0	4	91,3	6,3	85-100
TraP14 <i>dgt-32</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30,0	29,4	0-60
1680 g ae/ha	3	0	1	17,5	21,8	5-50
3360 g ae/ha	0	3	1	35,0	30,0	20-80
TraP24 <i>dgt-33</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21,3	14,9	5-40
420 g ae/ha	1	1	2	46,3	30,9	5-70
1680 g ae/ha	1	0	3	62,5	38,8	5-90
3360 g ae/ha	1	0	3	62,0	36,0	8-80
TraP8 <i>dgt-31</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)

0 g ae/ha glyphosat	4	0	0		0,0	0,0
105 g ae/ha glyphosat	0	1	3		43,8	17,0
420 g ae/ha glyphosat	1	2	1		43,8	32,5
1680 g ae/ha glyphosat	0	1	3		71,3	27,8
3360 g ae/ha glyphosat	0	0	4		81,3	8,5
TraP8 <i>dgt-32</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0		0,0	0,0
105 g ae/ha glyphosat	4	0	0		0,0	0,0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0		7,5	5,0
1680 g ae/ha glyphosat	3	1	0		10,8	9,6
3360 g ae/ha glyphosat	4	0	0		12,8	3,2
TraP8 <i>dgt-33</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0		0,0	0,0
105 g ae/ha glyphosat	4	0	0		0,0	0,0
420 g ae/ha glyphosat	4	0	0		2,5	3,8
1680 g ae/ha glyphosat	4	0	0		6,3	2,5
3360 g ae/ha glyphosat	3	1	0		20,0	13,5
<i>dgt-1</i> (đối chứng được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42,5	15,0	20-50
420 g ae/ha	0	2	2	38,8	11,1	25-50
1680 g ae/ha	0	0	4	79,0	19,4	50-90
3360 g ae/ha	0	0	4	50,0	0,0	50
Kiểu đại (đối chứng không được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0

105 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
TraP23 <i>dgt-31</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81,3	2,5	80-85
420 g ae/ha	0	0	4	97,3	4,9	90-100
1680 g ae/ha	0	0	4	90,0	7,1	85-100
3360 g ae/ha	0	0	4	91,3	6,3	85-100
TraP14 <i>dgt-32</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30,0	29,4	0-60
1680 g ae/ha	3	0	1	17,5	21,8	5-50
3360 g ae/ha	0	3	1	35,0	30,0	20-80
TraP24 <i>dgt-33</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21,3	14,9	5-40
420 g ae/ha	1	1	2	46,3	30,9	5-70
1680 g ae/ha	1	0	3	62,5	38,8	5-90
3360 g ae/ha	1	0	3	62,0	36,0	8-80
<i>dgt-1</i> (đối chứng được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42,5	15,0	20-50
420 g ae/ha	0	2	2	38,8	11,1	25-50

1680 g ae/ha	0	0	4	79,0	19,4	50-90
3360 g ae/ha	0	0	4	50,0	0,0	50
Kiểu đại (đối chứng không được biến nạp)	% tổn thương			% tổn thương		
Các trung bình	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
105 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
420 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Ví dụ 8: *Dgt-32* và *dgt-33* làm các chất đánh dấu để chọn lọc

Dgt-32 và *dgt-33 v1* được sử dụng làm các chất đánh dấu để chọn lọc với chất chọn lọc là glyphosat. Hiệu quả của các chất đánh dấu này được phân tích bằng *Arabidopsis* biến nạp. Khoảng 50 hạt *Arabidopsis* thế hệ T₄ (đồng hợp tử đối với *dgt-32* và *dgt-33 v1*) được trộn vào khoảng 5.000 hạt kiểu đại (mẫn cảm). Một số lần xử lý được so sánh, mỗi khay thực vật nhận một hoặc hai thời điểm dùng glyphosat theo một trong số các phác đồ xử lý sau: 7 DAP, 11 DAP, hoặc 7 tiếp theo là 11 DAP. Do tất cả các cá thể còn chứa gen *dsm-2* trong cùng vector biến nạp, *dgt-32* và *dgt-33* được chọn bằng glyphosat có thể được so sánh trực tiếp với *dsm-2* được chọn bằng glufosinat.

Việc xử lý được đưa vào bằng đầu phun DeVilbiss™. Các thực vật được nhận diện là kháng hoặc mẫn cảm 17 DAP. Việc xử lý bằng 26,25 - 280 g ae/ha 2,4-D được đưa vào 7 và 11 ngày sau khi trồng (DAP), là có hiệu quả tương đương về tần suất chọn lọc. Các kết quả này biểu thị rằng *dgt-32* và *dgt-33 v1* có thể được sử dụng một cách hiệu quả làm chất đánh dấu để chọn lọc.

Mức di truyền

Nhiều biến thể gen T₁ được cho tự thụ phấn để sản xuất hạt T₂. Hạt này là con cháu được thử nghiệm bằng cách đưa IGNITE™ (200 g ae/ha) vào 100 cá thể anh em T₂ ngẫu nhiên. Mỗi thực vật T₂ riêng được trồng vào chậu hình vuông kích thước 7,5 cm trước khi phun (máy phun theo đường ở mức dùng 187 l/ha). Các họ T₁ (các thực vật T₂) được phân ly trong mô hình 3 kháng: 1 mẫn cảm đã biết trước đối với locut

đơn được di truyền trội với sự di truyền theo thuyết Mendel như được xác định bằng phân tích khi bình phương ($P > 0,05$) được xác định.

Hạt được gom từ 5 đến 15 cá thể T_2 (hạt T_3). Hai mươi lăm cá thể anh em T_3 từ một trong số 3 họ T_2 được chọn ngẫu nhiên là con cháu được thử nghiệm. Dữ liệu cho thấy không có sự khác biệt chứng tỏ rằng mỗi *dgt-32* và *dgt-33* v l được hợp nhất ổn định và được di truyền theo kiểu Mendel cho ít nhất ba thế hệ.

Mô tả đặc điểm tính chống chịu thuốc diệt cỏ bổ sung của các dòng DGT T_3

Hạt *Arabidopsis* thế hệ T_3 được phân tầng, và được gieo vào các khay chọn lọc. Dòng đối chứng được biến nạp chứa *dgt-1* và đối chứng không được biến nạp được trồng theo cách tương tự. Các cây con được chuyển sang các chậu kích thước 3 inso (7,62-xentimet) riêng trong nhà kính. Tất cả các thực vật được phun bằng máy phun theo đường được thiết đặt ở 187 l/ha. Các thực vật được phun bằng glyphosat với lượng nằm trong khoảng từ 420-3360 g ae/ha (DURANGO™ DMA, Dow AgroSciences). Tất cả các lần dùng được pha chế trong nước. Mỗi lần xử lý được lặp lại 4 lần, và các thực vật được đánh giá ở 7 và 14 ngày sau khi xử lý.

Ví dụ 9: Sự biến nạp của loài cây trồng khác

Cây đậu tương được biến nạp bằng *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33* (có hoặc không có peptit vận chuyển lục lạp) để tạo ra tính kháng ở mức cao với thuốc diệt cỏ glyphosat, bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, các kỹ thuật gần giống như được mô tả ở trên trong ví dụ 11 hoặc ví dụ 13 của công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế PCT số WO 2007/053482.

Cây bông được biến nạp bằng *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33* (có hoặc không có peptit vận chuyển lục lạp) để tạo ra tính kháng ở mức cao với thuốc diệt cỏ glyphosat bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, các kỹ thuật gần giống như được mô tả ở trên trong ví dụ 14 của US 7,838,733, hoặc ví dụ 12 của công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế PCT số WO 2007/053482.

Cây canola được biến nạp bằng *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33* (có hoặc không có peptit vận chuyển lục lạp) để tạo ra tính kháng ở mức cao với thuốc diệt cỏ

glyphosat bằng cách sử dụng phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ, các kỹ thuật gần giống như được mô tả ở trên trong ví dụ 26 của US 7,838,733, hoặc ví dụ 22 của công bố đơn yêu cầu cấp patent quốc tế PCT số WO 2007/053482.

Ví dụ 10: Sự biến nạp của cây ngô

Các cấu trúc ADN để biến nạp cây ngô

Các phương pháp tách dòng chuẩn, như được mô tả trên đây, được sử dụng trong việc cấu trúc của các vector kép để sử dụng trong việc biến nạp cây ngô qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*. Bảng 16 liệt kê các vector được cấu trúc để biến nạp cây ngô. Các yếu tố gen sau được sử dụng trong các vector chứa *dgt-28*; trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* (ZmUbi1; US 5,510,474) được sử dụng để điều khiển trình tự mã hóa *dgt-28* được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' lipaza của *Zea mays* (ZmLip 3'UTR; US 7179902), bằng chất đánh dấu để chọn lọc bao gồm trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* được sử dụng để điều khiển trình tự mã hóa *aad-1* (US 7,838,733) được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' lipaza của *Zea mays*. Trình tự mã hóa *aad-1* truyền tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, như axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) và với các thuốc diệt cỏ aryloxyphenoxypropionat (AOPP).

Các cấu trúc *dgt-28* được xây dựng làm các vector kép và các vector hệ siêu kép *Agrobacterium* chuẩn (Japan Tobacco, Tokyo, JP). Các vector kép chuẩn bao gồm; pDAB107663, pDAB107664, pDAB107665, và pDAB107665. Các vector hệ siêu kép *Agrobacterium* bao gồm pDAB108384, pDAB108385, pDAB108386, và pDAB108387.

Các cấu trúc khác được hoàn thành chứa gen chỉ thị *yellow fluorescent protein* (*yfp*; US 2007/0298412). pDAB109812 chứa băng gen chỉ thị *yfp* được điều khiển bởi trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' *Zea mays* per 5 (Zm per5 3'UTR; US 7179902), bằng chất đánh dấu để chọn lọc bao gồm trình tự khởi động của virus bacilliform trên cây mía (SCBV; US 5,994,123) được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của *aad-1* và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' lipaza của *Zea mays*. pDAB101556 chứa băng *yfp* được điều khiển bởi trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* và được nằm bên

sườn bởi vùng không được dịch mã 3' *Zea mays* per 5, băng chất đánh dấu dễ chọn lọc bao gồm trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của *aad-1* và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' lipaza của *Zea mays*. pDAB107698 chứa băng *dgt-28* được điều khiển bởi trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' lipaza của *Zea mays*, băng *yfp* được điều khiển bởi trình tự khởi động Ubiquitin 1 của *Zea mays* và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' *Zea mays* per 5, băng chất đánh dấu dễ chọn lọc bao gồm trình tự khởi động của virus bacilliform trên cây mía được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của *aad-1* và được nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã 3' lipaza của *Zea mays*. Tất cả ba trong số các cấu trúc này là các vector kép chuẩn.

Bảng 16. Các vector biến nạp của cây ngô

Plasmit số	Fig. số	Mô tả các yếu tố gen
pDAB107663	34	Vector kép ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB107664	35	Vector kép ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB107665	36	Vector kép ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB107666	37	Vector kép ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB109812	38	Vector kép ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: SCBV / <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB101556	39	Vector kép ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB107698	40	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmLip 3'UTR::SCBV/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108384	41	Vector siêu kép ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR::ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108385	42	Tiền vector siêu kép ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108386	43	Tiền vector siêu kép ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108387	44	Tiền vector siêu kép ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR::ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR

Tiệt trùng bắp và tách phôi

Để thu được phôi chưa trưởng thành của cây ngô, các cây thuộc dòng lai cùng dòng *Zea mays* B104 được trồng trong nhà kính và được thụ phấn hoặc được thụ phấn giữa các cá thể anh em để tạo ra bắp. Bắp được thu hoạch khoảng 9-12 ngày sau khi thụ phấn. Vào ngày thử nghiệm, bắp được tiệt trùng trên bề mặt bằng cách ngâm trong dung dịch natri hypoclorit 20% (5%) và được lắc trong 20-30 phút, tiếp theo rửa ba lần trong nước vô trùng. Sau khi tiệt trùng, các phôi hợp tử chưa trưởng thành (1,5–2.4 mm) được cắt vô trùng từ mỗi bắp và được phân phối ngẫu nhiên vào các ống vi ly tam chứa môi trường gây nhiễm lỏng (Môi trường cơ bản LS, 4,43 gm/l; dung dịch Vitamin N6 [1000X], 1,00 ml/l; L-prolin, 700,0 mg/l; sucroza, 68,5 gm/l; D(+) glucoza, 36,0 gm/l; 10 mg/ml của 2,4-D, 150 µl/l). Đối với tập thử nghiệm đã cho, các phôi gộp lại từ ba bắp được sử dụng cho mỗi lần biến nạp.

Nuôi cấy khởi động *Agrobacterium*:

Phần dự trữ glyxerol của *Agrobacterium* chứa các vector biến nạp kép được mô tả trên đây được phân thành dải trên các đĩa môi trường tối thiểu AB chứa thuốc kháng sinh thích hợp và được phát triển ở nhiệt độ 20°C trong 3-4 ngày. Khuẩn lạc đơn được lựa chọn và được phân thành dải lên trên các đĩa YEP chứa cùng thuốc kháng sinh trên và được ủ ở nhiệt độ 28°C trong 1-2 ngày.

Nuôi cấy và đồng nuôi cấy *Agrobacterium*

Các khuẩn lạc *Agrobacterium* được lấy từ đĩa YEP, tạo huyền phù trong 10 ml môi trường gây nhiễm trong ống dùng một lần dung tích 50 ml, và mật độ tế bào được điều chỉnh đến OD₆₀₀ nm nằm trong khoảng 0,2-0,4 bằng cách sử dụng máy đo quang phổ. Môi trường nuôi cấy *Agrobacterium* được đặt trên máy lắc quay ở tốc độ 125 vòng/phút, nhiệt độ phòng, đồng thời tiến hành cắt phôi. Các phôi hợp tử chưa trưởng thành có kích thước nằm trong khoảng 1,5-2,4 mm được tách khỏi lõi ngô đã tiệt trùng và đặt trong 1 ml môi trường gây nhiễm và rửa một lần trong môi trường đó. Huyền phù *Agrobacterium* (2 ml) được bổ sung vào mỗi ống và các ống được đặt trên bộ máy lắc trong 10-15 phút. Các phôi được chuyển sang các môi trường đồng nuôi cấy (các muối MS, 4,33 gm/l; L-prolin, 700,0 mg/L; Myo-inositol, 100,0 mg/l; sản phẩm thủy phân casein bằng enzym 100,0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3,3 mg/l; sucroza, 30,0 gm/l; Gelzan™, 3,00 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; DMSO, 100 µM), được định hướng bằng vảy nhỏ quay mặt lên trên

và được ủ ở nhiệt độ 25°C, trong 24 giờ sáng ở cường độ sáng 50 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ trong 3 ngày.

Lựa chọn mô sẹo và tái sinh các biến thể gen giả định

Sau khoảng thời gian đồng nuôi cấy, các phôi được chuyển sang môi trường không hoạt động (các muối MS, 4,33 gm/l; L-prolin, 700,0 mg/l; 1,2,3,5/4,6-hexahydroxyxyclohexan, 100 mg/l; MES [(axit 2-(n-morpholino)-etansulfonic), axit tự do] 0,500 gm/l; sản phẩm thủy phân casein bằng enzym 100,0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3,3 mg/l; sucroza, 30,0 gm/l; Gelzan 2,30 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; Carbenicillin, 250,0 mg/l) mà không có chất chọn lọc và được ủ trong 24 giờ sáng ở cường độ sáng 50 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ và ở nhiệt độ 25°C trong 3 ngày.

Các thử nghiệm ức chế phát triển đáp ứng liều gợi ý rằng các nồng độ glyphosat bằng 0,25 mM và cao hơn là đủ để ức chế sự sinh trưởng tế bào ở dòng cây ngô B104 không được biến nạp. Các phôi được chuyển sang môi trường chọn lọc 1 chứa 0,5mM glyphosat (các muối MS, 4,33 gm/l; L-prolin, 700,0 mg/l; Myo-inositol, 100,0 mg/l; MES [(axit 2-(n-morpholino)-etansulfonic), axit tự do] 0,500 gm/l; sản phẩm thủy phân casein bằng enzym 100,0 mg/l; 30mM Dicamba-KOH, 3,3 mg/l; sucroza, 30,0 gm/l; Gelzan™ 2,30 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; Carbenicillin, 250,0 mg/l) và được ủ trong tối và/hoặc trong 24 giờ sáng ở cường độ sáng 50 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ trong 7-14 ngày ở nhiệt độ 28°C.

Các mô sẹo tạo phôi đang tăng sinh được chuyển sang môi trường chọn lọc 2 chứa 1,0 mM glyphosat (các muối MS, 4,33 gm/l; 1,2,3,5/4,6-hexahydroxyxyclohexan, 100 mg/l; L-prolin, 700,0 mg/l; MES [(axit 2-(n-morpholino)-etansulfonic), axit tự do] 0,500 gm/l; sản phẩm thủy phân casein bằng enzym 100,0 mg/l; 30 mM Dicamba-KOH, 3,3 mg/l; sucroza, 30,0 gm/l; Gelzan™ 2,30 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 15,0 mg/l; Carbenicillin, 250,0 mg/l; axit R-Haloxypop 0,1810 mg/l), và được ủ trong tối và/hoặc trong 24 giờ sáng ở cường độ sáng 50 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ trong 14 ngày ở nhiệt độ 28°C. Bước chọn lọc này cho phép mô sẹo chuyển gen tăng sinh và biệt hóa tiếp. Giai đoạn chọn lọc mô sẹo kéo dài trong ba đến bốn tuần.

Các mô sẹo tạo phôi đang tăng sinh được chuyển sang môi trường PreReg chứa 0,5 mM glyphosat (các muối MS, 4,33 gm/l; 1,2,3,5/4,6- hexahydroxycyclohexan, 100 mg/l; L-prolin, 350,0 mg/l; MES [(axit 2-(n-morpholino)-etansulfonic), axit tự do] 0,250 gm/l; sản phẩm thủy phân casein bằng enzym 50,0 mg/l; NAA-NaOH 0,500 mg/l; ABA-EtOH 2,50 mg/l; BA 1,00 mg/l; sucroza, 45,0 gm/l; Gelzan™ 2,50 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; 8,5 mg/ml AgNO₃, 1,00 mg/l; Carbenicillin, 250,0 mg/l) và được nuôi cấy trong 24 giờ sáng ở cường độ sáng 50 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ trong 7 ngày ở nhiệt độ 28°C.

Các mô sẹo tạo phôi có chồi giống cành non được chuyển sang môi trường tái sinh chứa 0,5 mM glyphosat (các muối MS, 4,33 gm/l; 1,2,3,5/4,6- hexahydroxycyclohexan, 100,0 mg/l; sucroza, 60,0 gm/l; gôm gellan G434™ 3,00 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; Carbenicillin, 125,0 mg/l) và được nuôi cấy trong 24 giờ sáng ở cường độ sáng 50 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ trong 7 ngày.

Chồi cây nhỏ có rễ đầu tiên được chuyển sang môi trường tạo rễ (các muối MS, 4,33 gm/l; MS-Vitamin cải biến [1000X], 1,00 ml/l; 1,2,3,5/4,6- hexahydroxycyclohexan, 100 mg/l; sucroza, 60,0 gm/l; gôm gellan G434™ 3,00 gm/l; Carbenicillin, 250,0 mg/l) trong các khay thực vật và được ủ trong 16/8 giờ sáng/tối ở cường độ sáng 140-190 $\mu\text{mol m}^{-2}$ giây⁻¹ trong 7 ngày ở nhiệt độ 27°C. Các cây non chuyển gen giả định được phân tích số bản sao gen chuyển bằng các quy trình được mô tả trên đây và được chuyển sang đất.

Xác nhận bằng phân tử sự có mặt của các gen chuyển *dgt-28* và *aad-1* trong cây ngô

Sự có mặt của các trình tự polynucleotit *dgt-28* và *aad-1* được xác nhận thông qua các thử nghiệm đoạn dò thủy giải. Cây ngô T₀ tách được được sàng lọc ban đầu thông qua thử nghiệm đoạn dò thủy giải, tương tự như TAQMAN™, để xác định sự có mặt của các gen chuyển *aad-1* và *dgt-28*. Dữ liệu thu được từ các nghiên cứu này được sử dụng để xác định số bản sao gen chuyển và được sử dụng để chọn lọc các biến thể gen cây ngô chuyển gen để lai ngược và tiến tới tạo ra T₁.

Các mẫu mô được gom trong đĩa 96 giếng, việc dầm mô được thực hiện bằng máy nghiền mô KLECO™ và các hạt bằng thép không gỉ (Hoover Precision Products, Cumming, GA), trong dung dịch đệm Qiagen™ RLT. Tiếp theo việc dầm mô, ADN hệ gen được tách ở dạng hiệu suất cao bằng cách sử dụng bộ kit Biosprint 96™ Plant

(Qiagen, Germantown, MD) theo quy trình được gợi ý của nhà sản xuất. ADN hệ gen được định lượng bằng bộ kit thử nghiệm Quant-IT™ Pico Green DNA (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). ADN hệ gen định lượng được điều chỉnh đến khoảng 2 ng/μl để thử nghiệm đoạn dò thủy giải bằng cách sử dụng bộ xử lý chất lỏng tự động hóa BIOROBOT3000™ (Qiagen, Germantown, MD). Việc xác định số bản sao gen chuyển bằng thử nghiệm đoạn dò thủy giải, tương tự như thử nghiệm TAQMAN®, được thực hiện bằng PCR theo thời gian thực bằng cách sử dụng hệ thống LIGHTCYCLER® 480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Các thử nghiệm được thiết kế đối với *aad-1*, *dgt-28* và gen tham chiếu nội Invertaza (số truy cập ngân hàng gen: U16123.1) bằng cách sử dụng phần mềm thiết kế đoạn dò LIGHTCYCLER® 2.0. Để khuếch đại, LIGHTCYCLER® 480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) được điều chế ở nồng độ cuối 1X trong phản ứng nhiều thành phần thể tích 10 μl chứa 0,4 μM của mỗi đoạn dò đối với *aad-1* và *dgt-28*, và 0,2 μM của mỗi đoạn dò (Bảng 17).

Phản ứng khuếch đại gồm hai bước được thực hiện với sự kéo dài ở nhiệt độ 60°C trong 40 giây với việc thu được huỳnh quang. Tất cả các mẫu được chạy và các giá trị ngưỡng chu kỳ (Cycle threshold - Ct) trung bình được sử dụng để phân tích mỗi mẫu. Phân tích dữ liệu PCR thời gian thực được thực hiện bằng phần mềm LightCycler™ phiên bản 1.5 sử dụng mô đun định lượng tương đối và dựa trên phương pháp $\Delta\Delta Ct$. Các đối chứng bao gồm mẫu của ADN hệ gen từ thực vật chuẩn có một bản sao và thực vật kiểm chứng có hai bản sao đã biết được bao gồm trong mỗi lần chạy. Bảng 18 liệt kê các kết quả của thử nghiệm đoạn dò thủy giải.

Bảng 17. Trình tự đoạn dò và đoạn dò được sử dụng cho thử nghiệm đoạn dò thủy giải của *aad-1*, *dgt-28* và gen tham chiếu nội (Invertaza).

Tên oligonucleotit	Gen phát hiện được	SEQ ID NO:	Trình tự oligo
GAAD1F	Mũi xuôi <i>aad-1</i>	58	TGTTTCGGTTCCTCTACCAA
GAAD1P	Đoạn dò <i>aad-1</i>	59	CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA
GAAD1R	Mũi ngược <i>aad-1</i>	60	CAACATCCATCACCTTGACTGA
Đoạn dò IV	Đoạn dò Invertaza	61	CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC
IVF-Taq	Mũi xuôi Invertaza	62	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR-Taq	Mũi ngược	63	AAAGTTTGGAGGCTGCCGT

	Invertaza		
zmDGT28 F	Mồi xuôi <i>dgt-28</i>	64	TTCAGCACCCGTCAGAAT
zmDGT28 FAM	Đoạn dò <i>dgt-28</i>	65	TGCCGAGAACTTGAGGAGGT
zmDGT28 R	Mồi ngược <i>dgt-28</i>	66	TGGTCGCCATAGCTTGT

Bảng 18. Các kết quả về lượng bản sao T_0 đối với các biến thể gen *dgt-28*. Các biến thể gen có số bản sao thấp bao gồm 1-2 bản sao gen chuyển, số biến thể gen có một bản sao được liệt kê trong ngoặc đơn. Các biến thể gen có số bản sao cao chứa nhiều hơn hoặc bằng 3 bản sao gen chuyển.

Plasmid được sử dụng để biến nạp	# biến thể gen có số bản sao thấp (một bản sao)	# biến thể gen có số bản sao cao
pDAB107663	43 (31)	10
pDAB107664	30 (24)	5
pDAB107665	40 (27)	10
pDAB107666	24 (12)	12
pDAB109812	2 (1)	0
pDAB101556	25 (15)	10
pDAB107698	3 (1)	2

Ví dụ 11: Tính chống chịu thuốc diệt cỏ ở cây ngô được biến nạp bằng *dgt-28*

Các biến thể gen biến nạp *dgt-28* của *Zea mays* (T_0) được cho thích nghi với môi trường trong nhà kính và được phát triển đến khi các thực vật biến đổi từ môi trường nuôi cấy mô đến các điều kiện phát triển trong nhà kính (tức là 2-4 lá mới, trông bình thường đã mọc lên từ vòng lá). Các thực vật được phát triển ở nhiệt độ 27°C trong điều kiện 16 giờ sáng:8 giờ tối trong nhà kính. Sau đó, các thực vật được xử lý bằng các chế phẩm thương mại của DURANGO DMA™ (chứa thuốc diệt cỏ glyphosat) kết hợp bổ sung 2% khối lượng/thể tích amoni-sulfat. Việc đưa thuốc diệt cỏ vào được thực hiện bằng máy phun theo đường ở thể tích phun 187 l/ha, chiều cao phun 50 cm. Các thực vật T_0 được phun bằng glyphosat với lượng nằm trong khoảng từ 280 – 4480 g ae/ha glyphosat, lượng này có khả năng làm tổn thương đáng kể cho các dòng cây ngô không được biến nạp. Liều gây chết được xác định là mức gây tổn thương >95% cho cây lai cùng dòng B104.

Các kết quả của các cây ngô *dgt-28* T₀ thể hiện rằng tính chống chịu với glyphosat là đạt được ở các mức lên đến 4480 g ae/ha. Loại môi trường cụ thể được sử dụng ở thể hệ T₀. Sự còi cọc tối thiểu và sự sinh trưởng toàn bộ thực vật của các thực vật biến nạp so với các đối chứng không được biến nạp thể hiện rằng *dgt-28* tạo ra tính chống chịu mạnh với glyphosat khi được liên kết với các peptit vận chuyển lục lạp TraP5, TraP8, và TraP23.

Các thực vật T₀ được chọn được tự phối hoặc được lai ngược để mô tả đặc điểm thêm ở thế hệ tiếp theo. 100 dòng *dgt-28* được chọn chứa các thực vật T₁ được phun bằng 140-1120 g ae/ha glufosinat hoặc 105-1680 g ae/ha glyphosat. Cả hai chất đánh dấu dễ chọn lọc và gen kháng glyphosat được cấu trúc trên cùng plasmit. Do đó, nếu một gen chịu được thuốc diệt cỏ được chọn bằng cách phun thuốc diệt cỏ, thì cả hai gen này được tin tưởng là có mặt. Ở 14 DAT, các thực vật kháng và mẫn cảm được đếm để xác định tỉ lệ phần trăm các dòng phân ly dưới dạng locut đơn, tính trạng Mendel nổi trội (3R:1S) (3 kháng: 1 mẫn cảm) như được xác định bằng phân tích khi bình phương. Dữ liệu này chứng tỏ rằng *dgt-28* có thể di truyền dưới dạng gen kháng glyphosat mạnh ở loài một lá mầm. Các mức glyphosat tăng dần được đưa vào các thực vật T₁ hoặc F₁ còn sống để mô tả thêm tính chống chịu và sự bảo vệ được tạo ra bởi gen *dgt-28*.

Tính chống chịu thuốc diệt cỏ được đưa vào sau khi cây mọc ở cây ngô T₀ được biến nạp bằng *dgt-28*. Các biến thể gen T₀ chứa *dgt-28* được liên kết với TraP4, TraP5, TraP8 và TraP23 được tạo ra bằng cách biến nạp *Agrobacterium* và được cho thích nghi với môi trường trong điều kiện buồng sinh trưởng có kiểm soát cho đến khi 2-4 lá mới, trông bình thường được mọc lên từ vòng lá. Các thực vật được định số nhận diện riêng và được lấy mẫu để phân tích số bản sao của cả hai *dgt-28* và *aad-1*. Dựa trên phân tích số bản sao, các thực vật được chọn để phân tích biểu hiện protein. Các thực vật này được chuyển sang chậu lớn hơn có môi trường phát triển mới và được phát triển ở nhiệt độ 27°C trong điều kiện 16 giờ sáng:8 giờ tối trong nhà kính. Các thực vật còn lại không được lấy mẫu để biểu hiện protein thì được xử lý bằng các chế phẩm thương mại của DURANGO DMA™ (glyphosat) kết hợp bổ sung 2% khối lượng/thể tích amoni-sulfat. Việc xử lý được phân bố sao cho mỗi nhóm thực vật chứa các biến thể gen T₀ có số bản sao thay đổi. Việc đưa thuốc diệt cỏ vào được thực hiện bằng máy phun theo đường ở thể tích phun 187 l/ha, chiều cao phun 50 cm. Các thực vật T₀ được

phun bằng glyphosat với lượng nằm trong khoảng từ 280-4480 g ae/ha glyphosat, có khả năng làm tổn thương đáng kể cho các dòng cây ngô không được biến nạp. Liều gây chết được xác định là mức gây tổn thương >95% cho cây lai cùng dòng B104. B104 là cơ sở di truyền của các thể biến nạp.

Các kết quả của các cây ngô *dgt-28* T₀ thể hiện rằng tính chống chịu với glyphosat là đạt được ở mức lên đến 4480 g ae/ha. Bảng 19. Sự còi cọc tối thiểu và sự sinh trưởng toàn bộ thực vật của các thực vật biến nạp so với các đối chứng không được biến nạp thể hiện rằng *dgt-28* tạo ra tính bảo vệ mạnh với glyphosat khi được liên kết với TraP5, TraP8, và TraP23.

Bảng 19. Đáp ứng của các biến thể gen *dgt-28* T₀ có số bản sao thay đổi với các mức của glyphosat nằm trong khoảng từ 280-4480 g ae/ha + 2,0% khối lượng/thể tích amoni sulfat 14 ngày sau khi xử lý.

TraP4 <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha	5	0	0	1,0	2,2	0-5
560 g ae/ha	6	0	0	2,0	4,0	0-10
1120 g ae/ha	12	0	0	1,3	3,1	0-10
2240 g ae/ha	7	0	0	1,7	4,5	0-12
4480 g ae/ha	7	0	0	1,1	3,0	0-8
TraP8 <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	6	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha	5	1	0	6,7	8,8	0-20
560 g ae/ha	0	2	0	20,0	0,0	20
1120 g ae/ha	7	0	0	1,4	2,4	0-5
2240 g ae/ha	3	1	0	7,5	15,0	0-30
4480 g ae/ha	6	0	0	1,7	4,1	0-10
TraP23 <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)

0 g ae/ha glyphosat	6	0	0	0,8	2,0	0-5
280 g ae/ha	7	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1120 g ae/ha	10	2	0	3,3	7,8	0-20
2240 g ae/ha	6	0	0	1,3	3,3	0-8
4480 g ae/ha	6	1	0	4,3	7,9	0-20
TraP5 <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
280 g ae/ha	7	1	0	5,0	14,1	0-40
560 g ae/ha	8	0	0	0,6	1,8	0-5
1120 g ae/ha	7	1	0	5,0	14,1	0-40
2240 g ae/ha	8	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	8	0	0	0,0	0,0	0

Phân tích biểu hiện protein bằng ELISA chuẩn thể hiện khoảng trung bình của protein DGT-28 từ 12,6 - 22,5 ng/cm² qua các cấu trúc được thử nghiệm.

Xác nhận tính chống chịu glyphosat ở thế hệ F₁ dưới các điều kiện trong nhà kính

Các thực vật T₀ có một bản sao không được phun được lai ngược với B104 cơ sở không được biến nạp để mô tả đặc điểm tiếp ở thế hệ tiếp theo. Ở thế hệ T₁, tính chống chịu glyphosat được đánh giá để xác nhận sự di truyền của gen *dgt-28*. Đối với các thực vật T₁, thuốc diệt cỏ ASSURE II™ (35 g ae/ha quizalofop-metyl) được đưa vào ở giai đoạn phát triển V1 để chọn lọc protein AAD-1. Cả hai chất đánh dấu để chọn lọc và gen kháng glyphosat được cấu trúc trên cùng plasmit. Do đó, nếu một gen được chọn, thì cả hai gen này được tin tưởng là có mặt. Sau 7 DAT, các thực vật kháng và mẫn cảm được đếm và các thực vật vô hiệu được loại bỏ khỏi quần thể. Dữ liệu này chứng tỏ rằng *dgt-28* (v1) có thể di truyền được dưới dạng gen kháng glyphosat mạnh ở loài một lá mầm. Các thực vật được lấy mẫu để mô tả đặc điểm của protein DGT-28 bằng ELISA chuẩn và hàm lượng sản phẩm phiên mã ARN. Các thực vật kháng được phun bằng 560-4480 g ae/ha glyphosat như được mô tả trên đây. Dữ liệu này thể hiện

tính chống chịu mạnh của *dgt-28* được liên kết với các peptit vận chuyển lục lạp TraP4, TraP5, TraP8 và TraP23 với lên đến 4480 g ae/ha glyphosat. Bảng 20.

Bảng 20. Đáp ứng của các biến thể gen *dgt-28* có một bản sao F₁ với các mức của glyphosat nằm trong khoảng từ 560-4480 g ae/ha + 2,0% khối lượng/thể tích amoni sulfat 14 ngày sau khi xử lý.

B104 / TraP4:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	9,0	1,2	8-10
2240 g ae/ha	4	0	0	2,5	2,9	0-5
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
B104 / TraP8:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,3	2,5	0-5
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	5,0	4,1	0-10
4480 g ae/ha	4	0	0	6,3	2,5	5-10
B104 / TraP23:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	3	1	0	10,0	10,0	5-25
1120 g ae/ha	2	2	0	18,8	11,8	10-35
2240 g ae/ha	4	0	0	12,5	2,9	10-15
4480 g ae/ha	3	1	0	10,0	7,1	5-20
B104 / TraP5:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8,0	0,0	8

1120 g ae/ha	4	0	0	11,3	3,0	8-15
2240 g ae/ha	4	0	0	12,5	2,9	10-15
4480 g ae/ha	4	0	0	10,0	2,5	10-15
B104 không được biến nạp	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Dữ liệu biểu hiện protein thể hiện khoảng protein DGT-28 trung bình từ 42,2 - 88,2 ng/cm² qua các biến thể gen T₁ và các cấu trúc được thử nghiệm, thiết lập sự biểu hiện protein ở thể hệ T₁.

Mô tả đặc điểm của cây ngô dgt-28 dưới các điều kiện trên cánh đồng

Các biến thể gen T₁ có một bản sao được gửi đến các địa điểm trên cánh đồng để tạo ra cả hai hạt lai bán hợp tử và hạt lai cùng dòng đồng hợp tử để mô tả đặc điểm tiếp. Các hạt lai được tạo ra bằng cách cho các biến thể gen T₁ ở dòng biến nạp B104 của cây ngô giao phối với dòng lai cùng dòng 4XP811 tạo ra quần thể lai phân ly 1:1 (bán hợp tử:vô hiệu) đối với biến thể gen này. Các hạt thu được được vận chuyển đến 2 địa điểm riêng. Tổng số năm biến thể gen có một bản sao trên mỗi cấu trúc được trồng ở mỗi địa điểm theo thiết kế khối hoàn toàn ngẫu nhiên ba lần. Các cánh đồng được thiết kế để đưa glyphosat vào ở giai đoạn phát triển V4 và nhóm riêng các thực vật để đưa vào ở giai đoạn phát triển V8. Thể lai thông thường 4XP811/B104 được sử dụng làm đối chứng âm tính.

Các hàng thử nghiệm được xử lý bằng 184 g ae/ha ASSURE II™ (106 g ai/l quizalofop-metyl) để loại bỏ các thực vật phân ly vô hiệu. Tất cả các đối tượng thử nghiệm được phân ly 1:1 (mẫn cảm:kháng) (p=0,05) liên quan đến việc dùng ASSURE II™. Các thực vật kháng được chọn được lấy mẫu từ mỗi biến thể gen để định lượng protein DGT-28 bằng ELISA chuẩn.

Các thực vật kháng quizalofop-metyl được xử lý bằng thuốc diệt cỏ thương mại DURANGO DMA™ (480 g ae/l glyphosat) đồng thời bổ sung 2,5% khối lượng/thể tích amoni-sulfat ở các giai đoạn phát triển V4 hoặc V8. Việc đưa thuốc diệt cỏ vào được thực hiện bằng máy phun mù được điều chỉnh để phân phối một thể tích bằng 187 l/ha, chiều cao phun 50 cm. Các thực vật được phun bằng glyphosat với lượng nằm trong khoảng từ 1120 - 4480 g ae/ha glyphosat, có khả năng làm tổn thương đáng kể cho các dòng cây ngô không được biến nạp. Liều gây chết được xác định là mức gây tổn thương >95% cho cây lai cùng dòng 4XP811. Việc đánh giá tổn thương nhìn thấy được được tính theo tỉ lệ phần trăm bệnh úa vàng nhìn thấy được, tỉ lệ phần trăm hoại tử, tỉ lệ phần trăm ức chế phát triển và tổng số tổn thương nhìn thấy được ở 7, 14 và 21 DAT (ngày sau khi xử lý). Việc đánh giá được so sánh với các thực vật kiểm chứng không được xử lý đối với mỗi dòng và các đối chứng âm tính.

Dữ liệu tổn thương nhìn thấy được đối với tất cả các thời điểm đánh giá thể hiện tính chống chịu mạnh với lên đến 4480 g ae/ha DURANGO DMA™ ở cả địa điểm và thời điểm dùng. Các biến thể gen điển hình đối với lần dùng ở giai đoạn V4 được biểu hiện từ một địa điểm và là phù hợp với các biến thể gen, các thời điểm dùng và các địa điểm khác. Bảng 21. Một biến thể gen từ cấu trúc chứa *dgt-28* được liên kết với TraP23 (pDAB107665) là chịu được việc chọn lọc bằng ASSURE II™ đối với protein AAD-1, nhưng mẫn cảm với tất cả các mức glyphosat được đưa vào.

Bảng 21. Đáp ứng của các biến thể gen *dgt-28* với glyphosat được đưa vào với lượng nằm trong khoảng 1120-4480 g ae/ha + 2,5% khối lượng/thể tích amoni sulfat ở giai đoạn phát triển V4.

4XPB11//B104/TraP4:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP8:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)

0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP23::dgt-28	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104/TraP5::dgt-28	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4XPB11//B104 không được biến nạp	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng g (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Việc đánh giá bổ sung được thực hiện trong giai đoạn phát triển sinh sản đối với mức glyphosat là 4480 g ae/ha. Việc đánh giá bằng mắt đối với còi, thời điểm thụ phấn và làm đầy bắp là tương tự như các thực vật kiểm chứng không được xử lý của mỗi dòng đối với tất cả các cấu trúc, thời điểm dùng và địa điểm. Các kết quả định lượng đối với protein DGT-28 thể hiện khoảng biểu hiện protein trung bình là 186,4 - 303,0 ng/cm². Dữ liệu này thể hiện tính chống chịu mạnh của cây ngô được biến nạp bằng *dgt-28* dưới các điều kiện trên cánh đồng qua các giai đoạn phát triển sinh sản với lên

đến 4480 g ae/ha glyphosat. Dữ liệu này cũng thể hiện việc phát hiện và chức năng protein DGT-28 dựa trên các kết quả về việc chịu được quá trình phun thuốc.

Xác định mức di truyền và tính chống chịu của cây ngô *dgt-28* ở trạng thái đồng hợp tử

Hạt từ T₁S₂ được gieo dưới các điều kiện trong nhà kính như được mô tả trên đây. Năm dòng có một bản sao giống như trên đã được mô tả đặc điểm dưới các điều kiện trên cánh đồng được mô tả đặc điểm ở trạng thái đồng nhất. Các thực vật được phát triển cho đến giai đoạn phát triển V₃ và được tách theo ba mức glyphosat nằm trong khoảng từ 1120-4480 g ae/ha glyphosat (DURANGO DMA™) và bốn lần lặp lại trên mỗi lần xử lý. Việc dùng được thực hiện bằng máy phun theo đường như được mô tả trên đây và được kết hợp với 2,0% khối lượng/thể tích amoni sulfat. Việc dùng amoni sulfat có tác dụng làm kiểm chứng không được xử lý đối với mỗi dòng. Việc đánh giá bằng mắt được thực hiện 7 và 14 ngày sau khi xử lý như được mô tả trên đây. Dữ liệu thể hiện tính chống chịu mạnh với lên đến 4480 g ae/ha glyphosat đối với tất cả các biến thể gen được thử nghiệm. Bảng 22.

Bảng 22. Đáp ứng của các biến thể gen *dgt-28* đồng hợp tử với glyphosat được đưa vào với lượng nằm trong khoảng 1120-4480 g ae/ha + 2,0% khối lượng/thể tích amoni sulfat.

TraP4:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	3,8	2,5	0-5
4480 g ae/ha	4	0	0	14,3	1,5	12-15
TraP8:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	9,0	1,2	8-10
4480 g ae/ha	4	0	0	11,3	2,5	10-15

TraP23:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	4,5	3,3	0-8
2240 g ae/ha	4	0	0	7,5	2,9	5-10
4480 g ae/ha	4	0	0	15,0	0,0	15
TraP5:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20%	20-40%	>40%	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	1,3	2,5	0-5
2240 g ae/ha	4	0	0	9,0	2,0	8-12
4480 g ae/ha	4	0	0	15,0	2,4	12-18
B104 không được biến nạp	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Dòng từ pDAB107665 không có tính chống chịu dưới các điều kiện trên cánh đồng thể hiện tính không chống chịu với glyphosat và do đó phù hợp với các quan sát trên cánh đồng (dữ liệu không được chỉ ra). Ngoại trừ một dòng được nêu trên, tất cả các bản sao đã được xử lý bằng glyphosat từ các dòng là không miễn cảm với glyphosat. Do đó, dữ liệu thể hiện mức di truyền đối với quần thể đồng nhất của cây ngô *dgt-28* theo kiểu Mendel. Sự biểu hiện của protein DGT-28 bằng ELISA chuẩn thể hiện khoảng biểu hiện protein trung bình từ 27,5 – 65,8 ng/cm² qua các biến thể gen có một bản sao chịu được glyphosat. Dữ liệu thể hiện protein chức năng và độ ổn định của protein DGT-28 qua các thể hệ.

Ví dụ 12: Tính chống chịu thuốc diệt cỏ sau khi cây mọc bằng cách sử dụng glyphosat làm chất đánh dấu để chọn lọc

Như được mô tả trên đây, các thực vật biến nạp T_0 được di chuyển ra khỏi môi trường nuôi cấy mô và được cho thích nghi với môi trường trong nhà kính. Các biến thể gen được thử nghiệm chứa *dgt-28* được liên kết với các peptit vận chuyển lục lạp TraP5, TraP8, và TraP23. Đã chứng tỏ rằng các thực vật T_0 này tạo ra tính chống chịu mạnh lên đến 4480 g ae/ha glyphosat, và các thực vật không được biến nạp được phòng trừ bằng glyphosat ở các nồng độ thấp đến 280 g ae/ha. Dữ liệu này chứng tỏ rằng *dgt-28* có thể được dùng làm chất đánh dấu để chọn lọc bằng cách sử dụng nồng độ glyphosat nằm trong khoảng từ 280 – 4480 g ae/ha.

Một số hạt từ các dòng cố định của cây ngô chứa gen chuyển *dgt-28* được trộn vào một số hạt ngô không được biến nạp. Hạt này được trồng và được để cho phát triển đến giai đoạn phát triển V1-V3, ở thời điểm đó các cây non được phun bằng liều glyphosat chọn lọc nằm trong khoảng 280 - 4480 g ae/ha. Sau 7-10 ngày, các thực vật mẫn cảm và kháng được đếm, và lượng các thực vật chịu được glyphosat tương quan với số hạt chuyển gen ban đầu chứa gen chuyển *dgt-28* được trồng.

Ví dụ 13: Xếp chồng cây ngô dgt-28

Protein AAD-1 được sử dụng làm chất đánh dấu để chọn lọc trong cây ngô biến nạp *dgt-28* nhằm các mục đích nghiên cứu. Gen *aad-1* cũng có thể được dùng làm tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ ở cây ngô để tạo ra tính chống chịu 2,4-D mạnh lên đến ứng dụng V8 ở cây trồng. Bốn biến thể gen từ các cấu trúc pDAB107663 (TraP4::*dgt-28*), pDAB107664 (TraP8::*dgt-28*) và pDAB107666 (TraP5::*dgt-28*) được đặc trưng về tính chống chịu của hỗn hợp trộn trong thùng của glyphosat và 2,4-D. Nghiên cứu mô tả đặc điểm được hoàn thành bằng hạt F_1 dưới các điều kiện trong nhà kính. Việc dùng được thực hiện bằng máy phun theo đường như được mô tả trên đây ở các mức sau. 1120-2240 g ae/ha glyphosat (chọn lọc đối với gen *dgt-28*), 1120-2240 g ae/ha 2,4-D (chọn lọc đối với gen *aad-1*), hoặc hỗn hợp trong thùng của hai thuốc diệt cỏ này ở các mức được mô tả. Các thực vật được phân loại ở 7 và 14 DAT. Các kết quả của việc phun thuốc diệt cỏ ở 2240 g ae/ha được thể hiện trong Bảng 23.

Bảng 23. Đáp ứng của cây ngô *aad-1* và *dgt-28* F_1 được phun bằng 2240 g ae/ha 2,4-D, glyphosat và hỗn hợp trộn trong thùng của hai thuốc diệt cỏ 14 ngày sau khi điều trị.

Biến thể gen F ₁	2240 g ae/ha 2,4-D		2240 g ae/ha glyphosat		2240 g ae/ha 2,4-D + 2240 g ae/ha glyphosat	
	% tổn thương trung bình	Độ lệch chuẩn	% tổn thương trung bình	Độ lệch chuẩn	% tổn thương trung bình	Độ lệch chuẩn
107663[3]-012.AJ001	5,0	4,1	3,8	4,8	8,8	3,0
107663[3]-029.AJ001	2,5	5,0	1,3	2,5	5,0	5,8
107663[3]-027.AJ001	2,5	2,9	11,8	2,9	13,8	2,5
107663[3]-011.AJ001	3,8	2,5	11,5	1,0	12,8	1,5
B104	27,5	17,7	100,0	0,0	100,0	0,0

Các kết quả này xác nhận rằng *dgt-28* có thể được xếp chồng thành công với *aad-1*, do đó làm tăng phổ diệt cỏ có thể được dùng cho cây trồng cần quan tâm (glyphosat + axit phenoxyaxetic lần lượt đối với *dgt-28* và *aad-1*). Trong quá trình sản xuất cây trồng trong đó khó phòng trừ các cỏ dại lá rộng hoặc tồn tại các biotyp cỏ dại kháng thì việc xếp chồng có thể được sử dụng như là cách phòng trừ cỏ dại và bảo vệ cây trồng cần quan tâm. Các tính trạng đầu vào hoặc đầu ra bổ sung cũng có thể được xếp chồng với gen *dgt-28* trong cây ngô và các thực vật khác.

Ví dụ 14: Sự biến nạp của các cây trồng khác

Các cây trồng khác được biến nạp bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết. Đối với sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của lúa mạch đen, xem, ví dụ, Popelka JC, Xu J, Altpeter F., “Generation of rye with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of (*Secale cereale* L.) plants instantly marker-free transgenic rye,” *Transgenic Res.* 2003 Oct;12(5):587-96.). Đối với sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của cây cao lương, xem, ví dụ, Zhao et al., “*Agrobacterium*-mediated sorghum transformation,” *Plant Mol Biol.* 2000 Dec;44(6):789-98. Đối với sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của cây lúa mạch, xem, ví dụ, Tingay et al., “*Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation,” *The Plant Journal*, (1997) 11: 1369–1376. Đối với sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của cây lúa mì, xem, ví dụ, Cheng et al., “Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*,” *Plant Physiol.* 1997 Nov;115(3):971-980. Đối với sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của cây

lúa, xem, ví dụ, Hiei et al., "Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*," Plant Mol. Biol. 1997 Sep;35(1-2):205-18.

Các kỹ thuật biến nạp khác (không qua *Agrobacterium*) được sử dụng để biến nạp *dgt-28*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*, ví dụ, vào cây ngô (*Zea mays*), cây lúa mì (*Triticum spp.*), cây lúa (*Oryza spp.* và *Zizania spp.*), cây lúa mạch (*Hordeum spp.*), cây bông (*Abroma augusta* và *Gossypium spp.*), cây đậu tương (*Glycine max*), cây củ cải đường (*Beta spp.*), cây mía (*Arenga pinnata*), cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* và *spp.* khác, *Physalis ixocarpa*, *Solanum incanum* và *spp.* khác, và *Cyphomandra betacea*), cây khoai tây (*Solanum tuberosum*), cây khoai lang (*Ipomoea batatas*), cây lúa mạch đen (*Secale spp.*), cây hồ tiêu (*Capsicum annuum*, *chinense*, và *frutescens*), cây rau diếp (*Lactuca sativa*, *perennis*, và *pulchella*), cây cải bắp (*Brassica spp.*), cây cần tây (*Apium graveolens*), cây cà tím (*Solanum melongena*), cây lạc (*Arachis hypogea*), cây cao lương (*Sorghum spp.*), cây cỏ linh lăng (*Medicago sativa*), cây cà rốt (*Daucus carota*), cây đậu (*Phaseolus spp.* và các chi khác), cây yến mạch (*Avena sativa* và *strigosa*), cây đậu Hà lan (*Pisum*, *Vigna*, và *Tetragonolobus spp.*), cây hướng dương (*Helianthus annuus*), cây bí (*Cucurbita spp.*), cây dưa chuột (*Cucumis sativa*), cây thuốc lá (*Nicotiana spp.*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), cỏ bãi (*Lolium*, *Agrostis*, *Poa*, *Cynodon*, và các chi khác), cỏ ba lá (*Trifolium*), cây đậu tằm (*Vicia*).

Tính kháng glyphosat được tạo ra bởi *dgt-28*, *dgt-32*, và *dgt-33* làm tăng khả năng áp dụng của thuốc diệt cỏ glyphosat để sử dụng trong mùa trong nhiều hệ thống thu hoạch cây gỗ xanh và rụng lá. Loài cây gỗ kháng thuốc diệt cỏ glyphosat làm tăng tính linh hoạt của việc sử dụng các thuốc diệt cỏ này ở phía bên trên mà không quan tâm đến việc tổn thương cây. Do đó, *dgt-28*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33* được biến nạp vào các loài cây gỗ: cây dương tía (*Alnus spp.*), cây tần bì (*Fraxinus spp.*), loài cây dương lá rung và cây bạch dương (*Populus spp.*), cây sồi (*Fagus spp.*), cây bu lô (*Betula spp.*), cây anh đào (*Prunus spp.*), cây bạch đàn (*Eucalyptus spp.*), cây mại châu (*Carya spp.*), cây thích (*Acer spp.*), cây sồi *Quercus* (*Quercus spp.*), và cây thông (*Pinus spp.*).

Tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat làm tăng khả năng áp dụng của các thuốc diệt cỏ glyphosat đối với việc phòng trừ cỏ dại chọn lọc ở các loài cây trang trí và cây ăn quả. Do đó, *dgt-28*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33* được biến nạp vào các loài cây trang trí và cây ăn quả: cây hoa hồng (*Rosa spp.*), cây Bụi lửa (*Euonymus spp.*), cây thuốc lá cảnh (*Petunia spp.*), cây thu hải đường (*Begonia spp.*), cây đỗ quyên (*Rhododendron spp.*),

cây táo tây dại hoặc táo (*Malus spp.*), cây lê (*Pyrus spp.*), cây đào (*Prunus spp.*), và cây cúc vạn thọ (*Tagetes spp.*).

Ví dụ 15: Xếp chồng với các tính trạng khác

Các cây chuyển gen chứa các tính trạng kháng côn trùng (IR) là thường thấy ở cây ngô, cây đậu tương và cây bông khắp Bắc Mỹ, và việc sử dụng các tính trạng này đang mở rộng toàn cầu. Các cây chuyển gen thương mại kết hợp các tính trạng kháng côn trùng và chịu được thuốc diệt cỏ (HT) đã được nghiên cứu bởi nhiều công ty hạt giống. Các tính trạng này bao gồm tính trạng *Bacillus thuringiensis* (ví dụ, độc tố Bt được nêu ở trang web lifesci.sussex.ac.uk, 2006), tính trạng kháng côn trùng không Bt, và bất kỳ hoặc tất cả các tính trạng HT nêu trên. Khả năng phòng trừ nhiều vấn đề của vật gây hại qua các tính trạng IR là khái niệm sản phẩm thương mại có thể đánh giá được. Tuy nhiên, tính thuận tiện của khái niệm sản phẩm này sẽ bị hạn chế nếu việc phòng trừ cỏ dại và phòng trừ côn trùng là độc lập với nhau.

Dgt-28, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*, riêng rẽ hoặc được xếp chồng với một hoặc nhiều tính trạng HT bổ sung, được xếp chồng với một hoặc nhiều tính trạng đầu vào bổ sung (ví dụ, tính kháng côn trùng, tính kháng nấm, hoặc tính chống chịu với điều kiện bất lợi, v.v.) (xem www.isb.vt.edu), qua việc gây giống thông thường hoặc cùng làm biến thể gen biến nạp mới. (Các) tính trạng IR được xếp chồng với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*. Khi thu được trình tự mã hóa của tính trạng IR, các yếu tố biểu hiện (ví dụ, trình tự khởi động, intron, 3'UTR, v.v.) được bổ sung và tính trạng IR được xếp chồng theo kiểu phân tử với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* thông qua phương pháp ADN tái tổ hợp.

Các tính trạng IR bao gồm: Cry1F (US 5,126,133; US 5,188,960; US 5,691,308; US 6,096,708; US 6,573,240; và US 6,737,273), Cry1A(c) (US 6,114,138; US 5,710,020; US 6,251,656; và US 6,229,004), Cry1F và Cry1A(c) dưới dạng xếp chồng bộ ba với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*, Cry34Ab(1) (US 7,323,556; US 7,897,342; US 7,888,495; US 7,875,430; US 7,932,033; US 7,956,246; US 6,340,593), Cry35 Ab(1) (US 6,340,593; US 7,323,556; US 7,897,342; US 7,888,495; US 7,875,430; US 7,932,033; US 7,956,246), và/hoặc Cry35Ab(1) và Cry 34Ab(1) dưới dạng xếp chồng bộ ba với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33*.

Các lợi ích bao gồm cải thiện việc phòng trừ cỏ dại được tạo ra bởi *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*, và được mô tả trong các ví dụ trước, liên kết với khả năng quản lý côn trùng gây hại và/hoặc các điều kiện nông học bất lợi khác. Các thực vật chứa các tính trạng như vậy được xếp chồng với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, và/hoặc *dgt-33* tạo ra gói nông nghiệp cải thiện chất lượng cây trồng hoàn chỉnh có khả năng phòng trừ linh hoạt và chi phí hiệu quả số vấn đề nông học bất kỳ. Các tính trạng IR và HT kết hợp có ứng dụng trong hầu hết các cây trồng nông nghiệp và làm vườn/trang trí và lâm nghiệp.

Sự kết hợp của *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*, và tính chống chịu thuốc diệt cỏ và tính kháng côn trùng tương ứng thu được bằng một số gen IR Bt hoặc không Bt bất kỳ có thể được đưa vào các loài cây trồng được liệt kê trong bản mô tả này. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ bất kỳ trong số các thuốc diệt cỏ thương mại khác nhau được liệt kê trong bản mô tả này trong các cây trồng có thể được thực hiện bằng cách biến nạp *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* và xếp chồng với tính trạng HT hoặc tính trạng IR tương ứng, bằng cách gây giống thông thường hoặc xử lý kỹ thuật di truyền. Các mức dùng cụ thể của các thuốc diệt cỏ điển hình trong số các hóa chất này được xác định bởi nhãn thuốc diệt cỏ được biên soạn trong sách CPR (Crop Protection Reference - Tài liệu bảo vệ cây trồng) hoặc tài liệu biên soạn tương tự, các nhãn được biên soạn trực tuyến (ví dụ, cdms.net/manuf/manuf.asp), hoặc hướng dẫn bảo vệ cây trồng thương mại hoặc học thuật bất kỳ như Crop Protection Guide của Agrilience (2005).

Ví dụ 16: Tính trạng DGT được xếp chồng với tính trạng AAD ở cây trồng bất kỳ

Bằng cách xếp chồng tính trạng *dgt* với tính trạng *aad* (ví dụ, *aad-1* được mô tả trong US 7,838,733; hoặc *aad-12* được mô tả trong công bố patent quốc tế PCT số WO 2007/053482 A2), qua việc gây giống thông thường hoặc cùng làm biến thể gen biến nạp mới, hiệu lực phòng trừ cỏ dại, tính linh hoạt, và khả năng quản lý sự biến đổi của cỏ dại và sự phát triển tính kháng thuốc diệt cỏ được cải thiện.

Việc biến nạp các cây trồng bằng *aad-1* cho phép nhà trồng trọt ứng dụng chọn lọc các thuốc diệt cỏ aryloxyalkanoat ở các cây trồng một lá mầm. Các cây trồng một lá mầm như vậy sẽ có giới hạn độ an toàn phenoxy auxin cao hơn. Ngoài ra, phenoxy auxin có thể được đưa chọn lọc vào các cây trồng hai lá mầm được biến nạp bằng *aad-1*. Việc biến nạp các cây trồng bằng *aad-12* cho phép nhà trồng trọt ứng dụng chọn lọc

các thuốc diệt cỏ pyridyloxy auxin và aryloxyalkanoat ở các cây trồng hai lá mầm để phòng trừ các loài cỏ dại. Bằng cách xếp chồng *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* với các tính trạng *aad-1* hoặc *aad-12*, các nhà trồng trọt đã tạo ra phổ diệt cỏ rộng hơn để quản lý cỏ dại. Ngoài ra, việc sử dụng kết hợp thuốc diệt cỏ dẫn đến tính linh hoạt hơn để quản lý tính kháng thuốc diệt cỏ trong các loài cỏ dại.

Các tùy chọn phòng trừ cỏ dại sau được đưa ra đối với thực vật trong đó tính trạng *dgt* và tính trạng *aad* được xếp chồng ở các loài cây trồng một lá mầm hoặc hai lá mầm bất kỳ:

A. Glyphosat được đưa vào ở mức dùng sau khi cây mọc chuẩn (420 đến 2160 g ae/ha, ví dụ, 560 đến 1120 g ae/ha) để phòng trừ hầu hết các loài cỏ và cỏ dại lá rộng. Các tính trạng *dgt* có thể tạo ra tính chống chịu ở các mức dùng glyphosat này. Để phòng trừ cỏ dại lá rộng kháng glyphosat như *Conyza canadensis* hoặc cỏ dại vốn đã khó phòng trừ bằng glyphosat (ví dụ, *Commelina* spp), 280-2240 g ae/ha (ví dụ, 560-1120 g ae/ha) 2,4-D được đưa vào liên tục, được trộn trong thùng, hoặc dưới dạng hỗn hợp trộn trước với glyphosat để tạo ra việc phòng trừ bổ sung. Cả hai *aad-1* và *aad-12* tạo ra tính chống chịu với 2,4-D. Ngoài ra, *aad-12* tạo ra tính chống chịu với các thuốc diệt cỏ pyridyloxy auxin như triclopyr và fluroxypyr. Các thuốc diệt cỏ pyridyloxy auxin được đưa vào để phòng trừ cỏ dại lá rộng kháng glyphosat như *Conyza canadensis* và *Commelina* spp. Đối với triclopyr, các mức dùng thường nằm trong khoảng từ 70-1120 g ae/ha, ví dụ, 140-420 g ae/ha. Đối với fluroxypyr, các mức dùng thường nằm trong khoảng từ 35-560 g ae/ha, ví dụ, 70-280 ae/ha.

B. Glyphosat được đưa vào ở mức dùng sau khi cây mọc chuẩn (420 đến 2160 g ae/ha, ví dụ, 560 đến 1120 g ae/ha) để phòng trừ hầu hết các loài cỏ và cỏ dại lá rộng. Để phòng trừ các loài cỏ kháng glyphosat như *Lolium rigidum* hoặc *Eleusine indica*, 10-200 g ae/ha (ví dụ, 20-100 g ae/ha) quizalofop được đưa vào liên tục, được trộn trong thùng, hoặc dưới dạng hỗn hợp trộn trước với glyphosat để tạo ra việc phòng trừ hiệu quả. *Aad-1* tạo ra tính chống chịu với quizalofop. Xếp chồng *aad-1* kết hợp với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* trong các loài cây trồng dẫn đến các cây trồng chịu được các thuốc diệt cỏ đã mô tả trên đây.

C. Glyphosat có hiệu quả trong việc phòng trừ các loài cỏ không phải là loài cỏ dại lá rộng. Các tính trạng xếp chồng *aad-1* và *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* cho

phép đưa các lượng glyphosat có hiệu quả diệt cỏ (105-840 g ae/ha, ví dụ, 210-420 g ae/ha). Sau đó, 2,4-D (ở 280-2240 g ae/ha, ví dụ, 560-1120 g ae/ha) được đưa vào liên tục, được trộn trong thùng, hoặc dưới dạng hỗn hợp trộn trước với các mức glyphosat có hiệu quả diệt cỏ để tạo ra việc phòng trừ cỏ dại lá rộng cần thiết. Thuốc diệt cỏ AOPP như quizalofop ở 10-200 g ae/ha (ví dụ, 20-100 g ae/ha và 20-35 g ae/ha), được sử dụng để phòng trừ cỏ dại mạnh hơn và/hoặc để làm chậm quá trình phát triển của cỏ kháng glyphosat. Mức glyphosat thấp cũng tạo ra một số lợi ích cho việc phòng trừ cỏ dại lá rộng; tuy nhiên, việc phòng trừ ban đầu là từ 2,4-D.

D. Tương tự như vậy, các tính trạng xếp chồng *aad-1* và *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* cho phép đưa các lượng glyphosat có hiệu quả diệt cỏ (105-840 g ae/ha, ví dụ, 210-420 g ae/ha). Sau đó, 2,4-D (ở 280-2240 g ae/ha, ví dụ, 560-1120 g ae/ha) được đưa vào liên tục, được trộn trong thùng, hoặc dưới dạng hỗn hợp trộn trước với các mức glyphosat có hiệu quả diệt cỏ để tạo ra việc phòng trừ cỏ dại lá rộng cần thiết. Triclopyr và fluroxypyr được sử dụng ở các mức nêu trên cũng là thành phần được chấp nhận trong chế độ xử lý. Mức glyphosat thấp cũng tạo ra một số lợi ích cho việc phòng trừ cỏ dại lá rộng; tuy nhiên, việc phòng trừ ban đầu là từ 2,4-D, triclopyr, hoặc fluroxypyr.

Việc sử dụng một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ aryloxy auxin thương mại riêng rẽ hoặc kết hợp (lần lượt hoặc độc lập) được làm thuận tiện bằng cách biến nạp *aad-12* vào cây trồng. Tương tự như vậy, việc sử dụng một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ phenoxy auxin thương mại riêng rẽ hoặc kết hợp (lần lượt hoặc độc lập) với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ AOPP thương mại được làm thuận tiện bằng *aad-1*. Xếp chồng mỗi trong số các tính trạng này với *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* cho phép quản lý các loài cỏ dại mạnh hơn. Các mức dùng cụ thể của các thuốc diệt cỏ khác điển hình trong số các hóa chất này được xác định bởi nhãn thuốc diệt cỏ được biên soạn trong sách CPR (Crop Protection Reference - Tài liệu bảo vệ cây trồng) hoặc tài liệu biên soạn tương tự, các nhãn được biên soạn trực tuyến (ví dụ, cdms.net/manuf/manuf.asp), hoặc hướng dẫn bảo vệ cây trồng thương mại hoặc học thuật bất kỳ như Crop Protection Guide của Agrilience (2005).

Ví dụ 17: Tính trạng DGT được xếp chồng với tính trạng AHAS ở cây trồng bất kỳ

Các tính trạng mã hóa tính chống chịu thuốc diệt cỏ imidazolinon (imidazolinone herbicide tolerance - *AHAS*) hiện có mặt ở một số các cây được trồng ở Bắc Mỹ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cây ngô, cây lúa, cây hướng dương, và cây lúa mì. Các cây trồng chịu được imidazolinon khác (ví dụ, cây bông và cây củ cải đường) đang được nghiên cứu. Nhiều thuốc diệt cỏ imidazolinon (ví dụ, imazamox, imazethapyr, imazaquin, và imazapic) hiện được sử dụng chọn lọc cho các cây trồng thông thường khác nhau. Việc sử dụng imazethapyr, imazamox, và imazapyr không chọn lọc đã được làm thuận tiện qua các tính trạng chịu được imidazolinon như *AHAS*. Các HTC chịu được imidazolinon cho đến nay có ưu điểm là không chuyển gen. Nhóm hóa chất này còn có hoạt tính tồn dư trong đất đáng kể, do đó, có thể tạo ra việc phòng trừ cỏ dại với các lần dùng cách xa, không giống như hệ dựa trên glyphosat hoặc glufosinat. Tuy nhiên, phổ cỏ dại được phòng trừ bởi các thuốc diệt cỏ imidazolinon không rộng bằng glyphosat (Agrilience, 2003). Ngoài ra, các thuốc diệt cỏ imidazolinon có cơ chế tác động (ức chế axetolactat syntaza, ALS) mà nhiều cỏ dại đã phát triển tính kháng (Heap I (2004). Điều tra quốc tế về các cỏ dại kháng thuốc diệt cỏ, có thể xem trên www.weedscience.com).

Dgt-28, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* được xếp chồng với tính trạng chịu được imidazolinon, qua việc gây giống thông thường hoặc cùng làm biến thể gen biến nạp mới, và hiệu lực phòng trừ cỏ dại, tính linh hoạt, và khả năng quản lý sự biến đổi của cỏ dại và sự phát triển tính kháng thuốc diệt cỏ được cải thiện.

Các tùy chọn phòng trừ cỏ dại sau được đưa ra đối với thực vật trong đó tính trạng *dgt* và tính trạng chịu được imidazolinon được xếp chồng ở các loài cây trồng một lá mầm hoặc hai lá mầm bất kỳ:

A. Imazethapyr được đưa vào ở mức dùng sau khi cây mọc chuẩn (35 đến 280 g ae/ha, ví dụ, 70-140 g ae/ha) để phòng trừ nhiều loài cỏ và cỏ dại lá rộng.

- i) Các cỏ dại lá rộng kháng chất ức chế ALS như *Amaranthus rudis*, *Ambrosia trifida*, *Chenopodium album* (trong số các cỏ khác, Heap, 2004) được phòng trừ bằng cách trộn glyphosat trong thùng ở 420 đến 2160 g ae/ha, ví dụ, 560 đến 1120 g ae/ha.

- ii) Các loài cỏ lá rộng vốn đã chịu được các thuốc diệt cỏ imidazolinon như *Ipomoea spp.* được phòng trừ bằng cách trộn glyphosat trong thùng ở 420 đến 2160 g ae/ha, ví dụ, 560 đến 1120 g ae/ha.
- iii) Các cỏ đại kháng chất ức chế ALS như *Sorghum halepense* và *Lolium spp.* được phòng trừ bằng cách trộn glyphosat trong thùng ở 420 đến 2160 g ae/ha, ví dụ, 560 đến 1120 g ae/ha.
- iv) Các loài cỏ đại vốn đã chịu được (ví dụ, *Agropyron repens*) được phòng trừ bằng cách trộn glyphosat trong thùng ở 420 đến 2160 g ae/ha, ví dụ, 560 đến 1120 g ae/ha.

Việc sử dụng thuốc diệt cỏ bất kỳ trong số các thuốc diệt cỏ imidazolinon hoặc thuốc diệt cỏ glyphosat thương mại khác nhau, riêng rẽ hoặc kết hợp nhiều thành phần, được làm thuận tiện bằng cách biến nạp *dgt-28* bằng *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*, và xếp chồng với tính trạng chịu được imidazolinon bất kỳ, bằng cách gây giống thông thường hoặc xử lý kỹ thuật di truyền. Các mức dùng cụ thể của các thuốc diệt cỏ khác diễn hình trong số các hóa chất này được xác định bởi nhãn thuốc diệt cỏ được biên soạn trong sách CPR (Crop Protection Reference - Tài liệu bảo vệ cây trồng) hoặc tài liệu biên soạn tương tự, các nhãn được biên soạn trực tuyến (ví dụ, cdms.net/manuf/manuf.asp), hoặc hướng dẫn bảo vệ cây trồng thương mại hoặc học thuật bất kỳ như Crop Protection Guide của Agrilience (2005).

Ví dụ 18: Biến nạp cây đậu tương

Cây đậu tương chuyển gen (*Glycine max*) chứa gen chuyển *dgt-28* được hợp nhất ổn định được tạo ra qua việc biến nạp mảnh cây điểm mắt lá mầm của cây đậu tương qua trung gian *Agrobacterium*. Chủng *Agrobacterium* bị vô hiệu hóa mang vectơ kép chứa *dgt-28* chức năng được sử dụng để khởi đầu biến nạp.

Sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình một nửa điểm mắt lá mầm cải biến của Zeng et al. (Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., (2004), *Plant Cell Rep.*, 22(7): 478-482). Nói ngắn gọn, hạt đậu tương (cv. Maverick) được nảy mầm trên môi trường cơ bản và các điểm mắt lá mầm được tách và gây nhiễm bằng *Agrobacterium*. Môi trường khởi tạo cành non, kéo dài cành non, và ra rễ được bổ sung bằng cefotaxime, timentin và vancomycin để loại bỏ *Agrobacterium*.

Việc chọn lọc thông qua thuốc diệt cỏ được dùng để ức chế sự sinh trưởng của cành non không được biến nạp. Các cành non được chọn được chuyển sang môi trường ra rễ để phát triển rễ và sau đó được chuyển sang đất trộn để làm các cây non thích nghi khí hậu.

Các lá non cuối cùng của cây non được chọn được xử lý tại chỗ (kỹ thuật sơn lá) bằng thuốc diệt cỏ để sàng lọc các thể biến nạp giả định. Các cây non đã sàng lọc được chuyển sang nhà kính, để thích nghi với môi trường và sau đó sơn lá bằng thuốc diệt cỏ để xác định lại tính chống chịu. Các thực vật T_0 biến nạp giả định này được lấy mẫu và việc phân tích phân tử được sử dụng để xác nhận sự có mặt của chất đánh dấu để chọn lọc diệt cỏ, và gen chuyển *dgt-28*. Các thực vật T_0 được cho tự thụ phấn trong nhà kính để tạo ra hạt T_1 .

Phương pháp biến nạp đậu tương thứ hai có thể được sử dụng để tạo ra các cây đậu tương chuyển gen khác. Chủng *Agrobacterium* bị vô hiệu hóa mang vector kép chứa *dgt-28* chức năng được sử dụng để khởi đầu biến nạp.

Sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình một nửa hạt cải biến của Paz et al., (Paz M., Martinez J., Kalvig A., Fonger T., and Walig K., (2005) *Plant Cell Rep.*, 25: 206-213). Nói ngắn gọn, các hạt đậu tương trưởng thành được tiệt trùng qua đêm bằng khí clo và ngâm trong H_2O vô trùng hai mươi giờ trước khi biến nạp thực vật qua trung gian *Agrobacterium*. Hạt được cắt đôi bằng cách cắt dọc theo rốn hạt để phân ly hạt và loại bỏ áo hạt. Trục phôi được cắt và cành non/nụ bất kỳ quanh trục được loại bỏ khỏi điểm mắt lá mầm. Mảnh cây một nửa hạt thu được được gây nhiễm bằng *Agrobacterium*. Môi trường khởi tạo cành non, kéo dài cành non, và ra rễ được bổ sung bằng cefotaxime, timentin và vancomycin để loại bỏ *Agrobacterium*. Việc chọn lọc bằng thuốc diệt cỏ được dùng để ức chế sự sinh trưởng của cành non không được biến nạp. Các cành non được chọn được chuyển sang môi trường ra rễ để phát triển rễ và sau đó được chuyển sang đất trộn để làm các cây non thích nghi khí hậu.

Các thực vật T_0 biến nạp giả định này được lấy mẫu và việc phân tích phân tử được sử dụng để xác nhận sự có mặt của chất đánh dấu để chọn lọc, và gen chuyển *dgt-28*. Một số các biến thể gen được xác định là chứa gen chuyển. Các thực vật T_0 này được phát triển để phân tích tiếp và được cho tự thụ phấn trong nhà kính để tạo ra hạt T_1 .

Xác định mức di truyền của *dgt-28* để tạo ra T_1 .

Mức di truyền của protein DGT-28 sang thế hệ T_1 được đánh giá theo một trong hai phương pháp. Phương pháp thứ nhất bao gồm gieo hạt T_1 vào môi trường Metro-mix và đưa 411 g ae/ha IGNITE™ 280 SL lên các thực vật đã nảy mầm ở giai đoạn phát triển có ba lá chét thứ nhất. Phương pháp thứ hai bao gồm đồng nhất hoá hạt đối với tổng số 8 bản sao bằng cách sử dụng ổ bi và máy nghiền Genogrinder. Sau đó, thử nghiệm dải ELISA để phát hiện protein PAT được sử dụng để phát hiện các biến thể gen có thể di truyền dưới dạng chất đánh dấu dễ chọn lọc nằm trên cùng plasmit như *dgt-28*. Đối với mỗi phương pháp, nếu thực vật đơn chịu được glufosinat hoặc được phát hiện bằng thử nghiệm dải băng ELISA PAT, thì biến thể gen này thể hiện tính di truyền với thế hệ T_1 .

Tổng số năm cấu trúc được sàng lọc về tính di truyền như được mô tả ở trên. Các plasmit chứa *dgt-28* được liên kết với TraP4, TraP8 và TraP23. Các biến thể gen qua các cấu trúc thể hiện mức di truyền protein PAT::DGT-28 cho thế hệ T_1 là 68%.

Tính chống chịu thuốc diệt cỏ được đưa vào sau khi cây mọc ở cây đậu tương T_1 được biến nạp bằng *dgt-28*. Các hạt từ các biến thể gen T_1 được xác định là có thể di truyền được bằng các phương pháp sàng lọc đã nêu trên được trồng trong môi trường Metro-mix dưới các điều kiện trong nhà kính. Các thực vật được trồng đến giai đoạn có ba lá chét thứ nhất được phát triển đầy đủ và được xử lý bằng 411 g ae/ha IGNITE™ 280 SL để chọn lọc gen *pat* như được mô tả ở trên. Các thực vật có tính kháng từ mỗi biến thể gen được cho ký hiệu nhận dạng duy nhất và được lấy mẫu để phân tích tình trạng tiếp hợp giao tử của gen *dgt-28*. Dữ liệu tình trạng tiếp hợp giao tử được sử dụng để gán 2 bản sao bán hợp tử và 2 bản sao đồng hợp tử cho mỗi mức glyphosat được dùng đối với tổng số 4 bản sao trên mỗi lần xử lý khi có đủ thực vật. Các thực vật này được so sánh đối với cây thuốc lá Petite havana kiểu dại. Tất cả các thực vật được phun bằng máy phun theo đường được thiết đặt ở 187 l/ha. Các thực vật này được phun muối dimethylamin (DMA) DURANGO™ với lượng nằm trong khoảng 560-4480 g ae/ha. Tất cả các lần dùng được pha chế trong nước bằng cách bổ sung 2% kl/tt amoni sulfat (AMS). Các thực vật được đánh giá ở 7 và 14 ngày sau khi xử lý. Các thực vật được xác định mức tổn thương đối với sự còi cọc, úa vàng, và hoại tử nhìn thấy được nói chung. Thế hệ T_1 đang phân ly, vì vậy một số đáp ứng dễ biến đổi được mong đợi do sự khác biệt về tình trạng tiếp hợp giao tử.

Bảng 24. Các kết quả phun thể hiện tính chống chịu mạnh lên đến 4480 g ae/ha glyphosat ở 14 DAT (ngày sau khi xử lý) của ít nhất một biến thể gen *dgt-28* trên mỗi

cấu trúc được mô tả đặc trưng. Các biến thể gen có một bản sao điển hình của các cấu trúc đều tạo ra tính chống chịu lên đến 4480 g ae/ha so với đối chứng âm tính Maverick.

pDAB107543 (TraP4:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	4	0	33,8	7,5	25-40
1120 g ae/ha	2	2	0	25,0	11,5	15-35
2240 g ae/ha	2	2	0	17,5	2,9	15-20
4480 g ae/ha	0	2	2	33,8	13,1	20-45
pDAB107545 (TraP8:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,5	1,0	0-2
1120 g ae/ha	4	0	0	2,8	1,5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5,0	2,4	2-8
4480 g ae/ha	4	0	0	9,5	1,9	8-12
pDAB107548 (TraP4:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1,8	2,4	0-5
1120 g ae/ha	4	0	0	2,8	1,5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	3,5	1,7	2-5
4480 g ae/ha	4	0	0	8,8	3,0	5-12
pDAB107553 (TraP23:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	5,0	0,0	5
1120 g ae/ha	4	0	0	9,0	1,2	8-10

2240 g ae/ha	4	0	0	10,5	1,0	10-12
4480 g ae/ha	4	0	0	16,5	1,7	15-18
Maverick (đối chứng âm)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	82,5	12,6	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Bảo vệ *dgt-28* chống lại các mức glyphosat tăng ở thể hệ T₂.

Thử nghiệm trên 45 thực vật con cháu được tiến hành trên hai đến năm dòng *dgt-28* T₂ trên mỗi cấu trúc. Các dòng đồng hợp tử được chọn dựa trên phân tích tình trạng tiếp hợp giao tử được hoàn thành ở thể hệ trước. Các hạt này được trồng như được mô tả ở trên. Sau đó, các thực vật được phun bằng 411 g ae/ha IGNITE 280 SL để chọn lọc chất đánh dấu để chọn lọc *pat* như được mô tả ở trên. Sau 3 DAT, các thực vật có tính kháng và miễn cảm được đếm.

Đối với các cấu trúc chứa TraP4 được liên kết với *dgt-28* (pDAB107543 và pDAB107548), chín trong số mười hai dòng được thử nghiệm không phân ly, từ đó xác nhận các dòng đồng nhất ở thể hệ T₂. Các dòng chứa TraP8 được liên kết với *dgt-28* (pDAB107545) thể hiện hai trong số bốn dòng không có con lai phân ly và thể hiện sự di truyền theo thuyết Mendel qua ít nhất hai thế hệ *dgt-28* ở cây đậu tương. Các mẫu mô được lấy từ các thực vật có tính kháng và protein DGT-28 được định lượng bằng phương pháp ELISA chuẩn. Dữ liệu minh họa khoảng protein DGT-28 trung bình từ 32,8 – 107,5 ng/cm² đối với các dòng T₂ không phân ly được thử nghiệm. Các dòng từ cấu trúc pDAB107553 (TraP23::*dgt-28*) không được chọn bằng glufosinat ở trên, và đáp ứng liều glyphosat được dùng để thử nghiệm với cả tính đồng nhất và tính chống chịu với các mức glyphosat tăng. Các bản sao từ các dòng từ cấu trúc pDAB107553 là chịu được các mức nằm trong khoảng 560-4480 g ae/ha glyphosat, và do đó xác nhận là quần thể đồng nhất và có thể di truyền được cho ít nhất hai thế hệ.

Các mức DMA DURANGO nằm trong khoảng 560-4480 g ae/ha glyphosat được đưa vào cây đậu tương có 2-3 lá chết như được mô tả ở trên. Dữ liệu tổn thương nhìn thấy được 14 DAT xác nhận các kết quả tính chống chịu được thể hiện ở thể hệ T₁.

Bảng 25. Dữ liệu này thể hiện tính chống chịu mạnh của cây thuốc lá *dgt-28* lên đến 3360 g ae/ha glyphosat qua hai thể hệ so với đối chứng không được biến nạp.

pDAB107543 (TraP4:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8,0	0,0	8
1120 g ae/ha	4	0	0	14,3	1,5	12-15
2240 g ae/ha	4	0	0	18,0	0,0	18
4480 g ae/ha	0	4	0	24,5	3,3	20-28
pDAB107545 (TraP8:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	2,8	1,5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5,0	0,0	5
4480 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10
pDAB107548 (TraP4:: <i>dgt-28</i>)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10

pDAB107553 (TraP23::dgt-28)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	-	0,0	0,0
560 g ae/ha	4	0	0	-	10,0	0,0
1120 g ae/ha	4	0	0	-	10,0	4,4
2240 g ae/ha	4	0	0	-	13,0	2,4
4480 g ae/ha	3	1	0	-	15,5	4,1
Maverick (đối chứng âm)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	77,5	15,0	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	97,5	2,9	95-100
2240 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100,0	0,0	100

Ví dụ 19: Biến nạp cây lúa bằng dgt-28

Theo phương pháp được nêu làm ví dụ, cây lúa chuyển gen (*Oryza sativa*) chứa gen chuyển *dgt-28* được hợp nhất ổn định được tạo ra thông qua sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của hạt lúa được tiệt trùng. Chủng *Agrobacterium* bị vô hiệu hóa mang vector kép chứa *dgt-28* chức năng được sử dụng để khởi đầu biến nạp.

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến độ pH 5,8 bằng KOH 1 M và được hoá cứng bằng 2,5 g/l Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Các mô sẹo tạo phôi được nuôi cấy trong đĩa petri kích thước 100 x 20 mm chứa 30 ml môi trường bán rắn. Các cây lúa non được trồng trên 50 ml môi trường trong các hộp MAGENTA. Huyền phù tế bào được giữ trong bình nón dung tích 125 ml chứa 35 ml môi trường lỏng và được quay ở tốc độ 125 vòng/phút. Tạo ra và duy trì môi trường tạo phôi xảy ra trong bóng tối ở nhiệt độ 25-26°C, và tái sinh thực vật và môi trường nuôi cấy toàn bộ thực vật xảy ra trong phòng được chiếu sáng với chu kỳ sáng 16 giờ (Zhang et al. 1996).

Việc tạo ra và duy trì mô sẹo tạo phôi được thực hiện trên môi trường cơ bản NB được cải biến như được mô tả trước đây (Li và các đồng tác giả 1993), trong đó môi

trường này được làm thích ứng để chứa 500 mg/l glutamin. Môi trường nuôi cấy huyền phù được khởi tạo và được duy trì trong môi trường lỏng SZ (Zhang và các đồng tác giả 1998) với việc bao gồm 30 g/l sucroza thay cho maltoza. Môi trường thẩm thấu (NBO) bao gồm môi trường NB với việc bổ sung 0,256 M mỗi chất manitol và sorbitol. Mô sẹo kháng thuốc diệt cỏ được chọn trên môi trường NB được bổ sung chất chọn lọc thuốc diệt cỏ thích hợp trong 3-4 tuần. Việc tiền tái sinh được thực hiện trên môi trường (PRH50) chứa môi trường NB với axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D), 1 mg/l axit α -naphthalenaxetic (NAA), 5 mg/l axit abscisic (ABA) và thuốc diệt cỏ chọn lọc trong 1 tuần. Việc tái sinh cây non sau khi nuôi cấy trên môi trường tái sinh (RNH50) chứa môi trường NB chứa 2,4-D, 0,5 mg/l NAA, và thuốc diệt cỏ chọn lọc cho đến khi cành non chuyển gen giả định được tái sinh. Cành non được chuyển sang môi trường ra rễ chứa một nửa các muối cơ bản Murashige và Skoog và các vitamin B5 của Gamborg, được bổ sung 1% sucroza và thuốc diệt cỏ chọn lọc.

Các hạt trưởng thành được sấy khô của *Oryza sativa* L. japonica cv. Taipei 309 được tiệt trùng như được mô tả trong Zhang và các đồng tác giả 1996. Các mô tạo phôi được tạo ra bằng cách cấy hạt lúa trưởng thành đã tiệt trùng trên môi trường NB trong bóng tối. Mô sẹo đầu tiên có đường kính xấp xỉ 1 mm được lấy ra khỏi vảy nhỏ và được sử dụng để khởi tạo hỗn dịch tế bào trong môi trường lỏng SZ. Sau đó, huyền phù được duy trì như được mô tả trong Zhang 1996. Các mô tạo phôi có nguồn gốc từ huyền phù được lấy ra khỏi môi trường nuôi cấy lỏng 3-5 ngày sau nuôi cấy cấp hai trước đó và được đặt trên môi trường thẩm thấu NBO để tạo ra vòng tròn đường kính khoảng 2,5 cm trong đĩa petri và được nuôi cấy trong 4 giờ trước khi bắn phá. Mười sáu đến hai mươi giờ sau khi bắn phá, mô được chuyển từ môi trường NBO lên trên môi trường chọn lọc NBH50, đảm bảo rằng bề mặt được bắn quay lên trên, và ủ trong bóng tối trong 14–17 ngày. Sau đó, mô sẹo được tạo mới được tách khỏi mảnh cấy được bắn phá ban đầu và được đặt gần nhau trên cùng môi trường. Sau 8-12 ngày tiếp theo, mô sẹo đục, tương đối chắc được nhận diện bằng mắt, và được chuyển sang môi trường tiền tái sinh PRH50 trong 7 ngày trong bóng tối. Mô sẹo đang phát triển, trở nên chắc và đục hơn sau đó được nuôi cấy cấp hai trên môi trường tái sinh RNH50 trong chu kỳ 14–21 ngày dưới chu kỳ sáng 16 giờ. Cành non đang tái sinh được chuyển sang các hộp MAGENTA chứa môi trường $\frac{1}{2}$ MSH50. Nhiều thực vật được tái sinh từ mảnh cấy đơn được coi là các cá thể anh em và được xử lý như một dòng thực vật độc lập. Thực vật được tính điểm dương

đối với gen *dgt-28* nếu nó tạo ra rễ dày, trắng và phát triển mạnh trên môi trường ½ MSH50. Ngay khi cây non đạt đến đỉnh hộp MAGENTA, chúng được chuyển sang đất trong chậu kích thước 6 cm dưới độ ẩm 100% trong một tuần, và sau đó được chuyển sang buồng sinh trưởng với chu kỳ sáng 14 giờ ở nhiệt độ 30°C và trong bóng tối ở nhiệt độ 21°C trong 2–3 tuần trước khi cấy vào chậu kích thước 13 cm trong nhà kính. Các hạt được thu lại và để khô ở nhiệt độ 37°C trong một tuần trước khi bảo quản ở nhiệt độ 4°C.

Phân tích T₀ của cây lúa *dgt-28*

Thế biến nạp cây lúa đã cấy được tạo ra thông qua biến nạp *Agrobacterium* được cấy vào môi trường và được cho thích nghi với các điều kiện trong nhà kính. Tất cả các thực vật được lấy mẫu để phát hiện *dgt-28* bằng PCR và các kết quả thể hiện hai mươi hai biến thể gen PCR dương đối với pDAB110827 (TraP8::*dgt-28*) và tối thiểu mười sáu biến thể gen PCR dương đối với pDAB110828 (TraP23::*dgt-28*). Phân tích thẩm tách Southern đối với *dgt-28* của các biến thể gen PCR dương thể hiện các biến thể gen đơn giản (1-2 bản sao) đối với cả hai cấu trúc. Sự biểu hiện protein của các biến thể gen T₀ được chọn thể hiện khoảng biểu hiện protein DGT-28 từ mức phát hiện thấp đến 130 ng/cm². Các biến thể gen T₀ được chọn từ cấu trúc pDAB110828 được xử lý bằng 2240 g ae/ha DURANGO DMA™ như được mô tả trước đây và được đánh giá 7 và 14 ngày sau khi xử lý. Dữ liệu thể hiện tính chống chịu mạnh với mức glyphosat được dùng. Tất cả các thực vật PCR dương được cho tạo ra hạt T₁ để mô tả đặc điểm thêm.

Mức di truyền *dgt-28* ở cây lúa

Thử nghiệm trên 100 thực vật con cháu được tiến hành trên bốn dòng T₁ của *dgt-28* từ cấu trúc pDAB110827 chứa peptit vận chuyển lục lạp TraP8. Các hạt được trồng vào chậu được nhồi với môi trường. Sau đó, tất cả thực vật được phun bằng 560 g ae/ha DURANGO DMA™ để chọn lọc gen *dgt-28* như được mô tả trước đây. Sau 7 DAT, các thực vật có tính kháng và miễn cảm được đếm. Hai trong số bốn dòng được thử nghiệm đối với mỗi cấu trúc được phân ly dưới dạng locut đơn, tính trạng Mendel nổi trội (3R:1S) như được xác định bằng phân tích khi bình phương. *Dgt-28* là gen kháng glyphosat có thể di truyền được trong nhiều loài.

Tính chống chịu thuốc diệt cỏ được đưa vào sau khi cây mọc ở cây lúa T₁ được biến nạp bằng *dgt-28*. Các thực vật có tính kháng T₁ từ mỗi biến thể gen được sử dụng trong thử nghiệm ở con cháu được cho ký hiệu nhận dạng duy nhất và được lấy mẫu để

phân tích tình trạng tiếp hợp giao tử của gen *dgt-28*. Dữ liệu tình trạng tiếp hợp giao tử được sử dụng để gán 2 bản sao bán hợp tử và 2 bản sao đồng hợp tử cho mỗi mức glyphosat được dùng đối với tổng số 4 bản sao trên mỗi lần xử lý. Các thực vật này được so sánh đối với cây lúa kitaake kiểu dại. Tất cả các thực vật được phun bằng máy phun theo đường được thiết đặt ở 187 l/ha. Các thực vật này được phun DURANGO DMA™ với lượng nằm trong khoảng 560-2240 g ae/ha. Tất cả các lần dùng được pha chế trong nước bằng cách bổ sung 2% kl/tt amoni sulfat (AMS). Các thực vật được đánh giá ở 7 và 14 ngày sau khi xử lý. Các thực vật được xác định mức tổn thương đối với sự còi cọc, úa vàng, và hoại tử nhìn thấy được nói chung. Thế hệ T₁ đang phân ly, vì vậy một số đáp ứng dễ biến đổi được mong đợi do sự khác biệt về tình trạng tiếp hợp giao tử.

Các kết quả phun thể hiện ở 7 DAT (ngày sau khi xử lý) tổn thương sinh dưỡng tối thiểu với các mức glyphosat tăng được phát hiện (dữ liệu không được chỉ ra).

Bảng 26. Dữ liệu tổn thương nhìn thấy được ở 14 DAT thể hiện tổn thương nhìn thấy được trung bình nhỏ hơn 15% lên đến 2240 g ae/ha glyphosat.

TraP8:: <i>dgt-28</i> biến thể gen 1	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
TraP8:: <i>dgt-28</i> biến thể gen 2	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3,8	4,8	0-10
1120 g ae/ha	4	0	0	12,0	3,6	8-15
2240 g ae/ha	4	0	0	15,0	6,0	8-20
Đối chứng không được biến nạp	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)

0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	81,3	2,5	80-85
1120 g ae/ha	0	0	4	95,0	5,8	90-100
2240 g ae/ha	0	0	4	96,3	4,8	90-100

Sự phát hiện protein của DGT-28 được đánh giá đối với các bản sao từ tất cả bốn dòng T₁ được thử nghiệm từ pDAB110827. Dữ liệu thể hiện khoảng protein trung bình DGT-28 từ 20-82 ng/cm² và 21-209 ng/cm² lần lượt đối với các bản sao bán hợp tử và đồng hợp tử. Các kết quả này thể hiện sự biểu hiện protein ổn định với thể hệ T₁ và tính chống chịu của cây lúa *dgt-28* lên đến 2240 g ae/ha glyphosat sau khi dùng 560 g ae/ha glyphosat được sử dụng để chọn lọc.

Ví dụ 20: Biến nạp cỏ bãi bằng dgt-28

Sự biến nạp di truyền của gen chuyển *dgt-28* qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens* ở cỏ ống (creeping bentgrass) đạt được qua mô sẹo tạo phôi được bắt đầu từ hạt (cv. Penn-A-4). Xem “Efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated turfgrass (*Agrostis stolonifera* L) transformation” (Luo và các đồng tác giả, 2004).

Các tế bào mô sẹo được gây nhiễm bằng chủng *A. tumefaciens* mang vector siêu kép chứa gen chuyển kháng thuốc diệt cỏ (ví dụ, *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*) được điều khiển bởi trình tự khởi động cụ thể của thực vật một lá mầm. Hiệu quả biến nạp ổn định nói chung nằm trong khoảng từ 18% đến 45%. Phân tích di truyền và thẩm tách Southern xác nhận sự hợp nhất gen chuyển trong hệ gen cỏ ống và sự truyền bình thường và biểu hiện ổn định của gen chuyển ở thể hệ T₁. Tất cả các biến thể gen biến nạp độc lập mang một đến ba bản sao của gen chuyển, và chủ yếu (60–65%) chỉ chứa một bản sao của gen chuyển mà không có sự sắp xếp lại thấy rõ.

Các hạt trưởng thành được bóc bằng giấy ráp và bề mặt được tiệt trùng trong 10% (thể tích/thể tích) chất tẩy trắng Clorox™ (6% natri hypoclorit) cộng với 0,2% (thể tích/thể tích) Tween 20 (polysorbat 20) kết hợp lắc mạnh trong 90 phút. Sau khi giữ năm lần trong nước cất vô trùng, các hạt này được đặt lên trên môi trường tạo mô sẹo (muối MS cơ bản và vitamin, 30 g/l sucroza, 500 mg/l chất thủy phân casein, 6,6 mg/l axit 3,6-diclo-*o*-anisic (dicamba), 0,5 mg/l 6-benzylaminopurin (BAP) và 2 g/l Phytigel. Độ pH của môi trường được điều chỉnh đến 5,7 trước khi hấp ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút).

Các đĩa môi trường nuôi cấy chứa các mảnh hạt đã chuẩn bị được giữ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 6 tuần. Các mô sẹo tạo phôi được chọn bằng mắt và được nuôi cấy cấp hai trên môi trường tạo mô sẹo mới trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần trước khi đồng nuôi cấy.

Một ngày trước khi gây nhiễm qua trung gian *Agrobacterium*, mô sẹo tạo phôi được chia thành các mảnh 1 đến 2 mm và được đặt lên trên môi trường tạo mô sẹo chứa 100 μ M axetosyringon. Phần mẫu 10 μ l của huyền phù *Agrobacterium* (OD=1,0 ở 660 nm) chứa gen chuyển *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* sau đó được đưa vào mỗi mảnh mô sẹo, tiếp theo đồng nuôi cấy 3 ngày trong bóng tối ở nhiệt độ 25°C. Sau đó, mô sẹo được chuyển và được nuôi cấy trong 2 tuần trên môi trường tạo mô sẹo cộng với 125 mg/l cefotaxime và 250 mg/l carbenicillin để hạn chế sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Việc chọn lọc các thực vật chuyển gen xảy ra khi mô sẹo được chuyển sang môi trường tạo mô sẹo chứa 250 mg/l cefotaxime và thuốc diệt cỏ. Nguyên liệu mô sẹo được duy trì trên môi trường này trong 8 tuần với khoảng thời gian nuôi cấy cấp hai chọn lọc là 3 tuần. Quá trình chọn lọc được thực hiện ở nhiệt độ phòng trong bóng tối.

Để tái sinh thực vật, các biến thể gen mô sẹo đang tăng sinh kháng thuốc diệt cỏ ban đầu được chuyển sang môi trường tái sinh (môi trường cơ bản MS, 30 g/l sucroza, 100 mg/l myo-inositol, 1 mg/l BAP và 2 g/l Phytigel) được bổ sung cefotaxime, và thuốc diệt cỏ để chọn lọc. Các mô sẹo này được giữ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 1 tuần và sau đó được chuyển sang sáng trong 2–3 tuần để phát triển cành non.

Cành non đã phát triển được tách và được chuyển sang môi trường tái sinh không hormon chứa thuốc diệt cỏ và cefotaxime để thúc đẩy sự sinh trưởng rễ trong khi duy trì áp lực chọn lọc và ngăn chặn các tế bào *Agrobacterium* còn lại bất kỳ. Sau đó, các cây non có rễ đã phát triển tốt (3–5 tuần) được chuyển sang đất và được trồng trong nhà kính hoặc trên cánh đồng.

Các thực vật chuyển gen được giữ ngoài trời trong vườn chứa (3-6 tháng) cho đến đông chí vào tháng mười hai. Sau đó, các thực vật đã xuân hóa được chuyển sang nhà kính và được giữ ở nhiệt độ 25°C với chu kỳ sáng 16/8 giờ và được bao quanh bởi các thực vật đối chứng không chuyển gen tách về mặt vật lý các thực vật chuyển gen khỏi các nguồn phấn hoa khác. Các thực vật chuyển gen bắt đầu ra hoa 3-4 tuần sau khi được chuyển trở lại vào nhà kính. Các thực vật này được lai ngoài dòng bằng phấn hoa từ các

thực vật đối chứng xung quanh. Các hạt thu được từ mỗi thực vật chuyển gen riêng được cho nảy mầm trong đất ở nhiệt độ 25°C, và các thực vật T₁ được phát triển trong nhà kính để phân tích tiếp.

Các cỏ khác được biến nạp bằng *dgt-28* theo quy trình được mô tả, bao gồm cỏ meadowgrass hàng năm (*Poa annua*), cỏ Bahia, cỏ ống Bentgrass, cỏ Bermuda, cỏ màu xanh da trời, cỏ cuống xanh da trời, cỏ Brachiaria, cỏ dứa, cỏ Browntop bent (*Agrostis capillaries*), cỏ trâu, cỏ Canary, cỏ thảm, cỏ rét, cỏ đuôi trâu Chewings (*Festuca rubra commutate*), cỏ túc nhỏ, cỏ ống (*Agrostis stolonifera*), cỏ tóc có mào (*Koeleria macrantha*), cỏ Dallis, cỏ đuôi trâu, cỏ Festolium, cỏ đuôi trâu cứng/cừu (*Festuca ovina*), cỏ Grama, cỏ Ấn Độ, cỏ Johnson, cỏ may, hỗn hợp (ngựa, đồng cỏ, v.v.), cỏ mọc tự nhiên, cỏ vườn, cỏ mạch đen lâu năm (*Lolium perenne*), cỏ Redtop, cỏ Rescue, cỏ mạch đen hàng năm và lâu năm, cỏ đuôi trâu đỏ mảnh (*Festuca rubra trichophylla*), cỏ meadowgrass thân mềm (*Poa pratensis*), cỏ St. Augustine, cỏ đuôi trâu đỏ khỏe (*Festuca rubra rubra*), cỏ Xu-đăng, cỏ kê, cỏ đuôi trâu cao (*Festuca arundinacea*), cỏ tóc mọc thành cụm (*Deschampsia caespitosa*), cỏ Turfgrass, cỏ mạch, và cỏ nhung Nhật.

Ví dụ 21: Biến nạp *Brassica* spp. bằng chủng DGT

Gen *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* truyền tính kháng glyphosat được sử dụng để biến nạp *Brassica napus* var. Nexera™ 710 bằng cách biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*.

Các hạt *Brassica napus* được tiệt trùng bề mặt bằng 10% chất tẩy trắng thương mại trong 10 phút và được rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó, các hạt này được đặt lên trên môi trường cơ bản MS có nồng độ một nửa (Murashige và Skoog, 1962) và được duy trì dưới thiết đặt chế độ sinh trưởng ở nhiệt độ 25°C, và chu kỳ sáng là 16 giờ sáng/8 giờ tối.

Các đoạn trụ dưới lá mầm (3-5 mm) được cắt từ cây con 5 - 7 ngày tuổi và được đưa lên môi trường tạo mô sẹo K1D1 (môi trường MS có 1 mg/l kinetin và 1 mg/l 2,4-D) trong 3 ngày dưới dạng trước khi xử lý. Sau đó, các đoạn này được chuyển vào đĩa petri và được xử lý bằng chủng *Agrobacterium tumefaciens* chứa cấu trúc chứa *dgt-28*. *Agrobacterium tumefaciens* được trồng qua đêm ở nhiệt độ 28°C trong bóng tối trên máy lắc ở tốc độ 150 vòng/phút và tiếp theo tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy.

Sau 30 phút xử lý các đoạn trụ dưới lá mầm bằng *Agrobacterium*, các đoạn này được đặt trở lại môi trường tạo mô sẹo trong 3 ngày. Sau khi đồng nuôi cấy, các đoạn này được đặt trong K1D1TC (môi trường tạo mô sẹo chứa 250 mg/l Carbenicillin và 300 mg/l Timentin) trong một tuần để hồi phục. Cách khác, các đoạn này được đặt trực tiếp lên môi trường chọn lọc K1D1H1 (môi trường trên với thuốc diệt cỏ). Carbenicillin và Timentin là các thuốc kháng sinh được sử dụng để tiêu diệt *Agrobacterium*. Chất chọn lọc cho phép sinh trưởng các tế bào biến nạp.

Các mẫu mô sẹo từ các biến thể gen độc lập tách được được thử nghiệm bằng PCR. Các mẫu là dương tính thử nghiệm đối với sự có mặt của *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33* được xác nhận và tiếp theo được đưa sang môi trường để tái sinh. Sau đó, các đoạn trụ dưới lá mầm đã được tạo mô sẹo được đưa lên môi trường tái sinh cành non B3Z1H1 (môi trường MS, 3 mg/l benzylamino purin, 1 mg/l Zeatin, 0,5 gm/l MES [axit 2-(N-morpholino) etan sulfonic], 5 mg/l bạc nitrat, thuốc diệt cỏ chọn lọc, Carbenicillin và Timentin). Sau 3 tuần, cành non bắt đầu tái sinh. Các đoạn trụ dưới lá mầm cùng với cành non được chuyển sang môi trường B3Z1H3 (môi trường MS, 3 mg/l benzylamino purin, 1 mg/l Zeatin, 0,5 gm/l MES [axit 2-(N-morpholino) etan sulfonic], 5 mg/l bạc nitrat, thuốc diệt cỏ chọn lọc, Carbenicillin và Timentin) trong 3 tuần nữa.

Cành non được cắt từ các đoạn trụ dưới lá mầm và được chuyển sang môi trường kéo dài cành non MESH10 (MS, 0,5 gm/l MES, thuốc diệt cỏ chọn lọc, Carbenicillin, Timentin) trong 2-4 tuần. Cành non đã kéo dài được nuôi cấy để tạo rễ trên MSI.1 (MS với 0,1 mg/l axit indolbutyric). Khi các thực vật đã tạo được hệ rễ, chúng được cấy vào đất. Các thực vật này được cho thích nghi với môi trường dưới các điều kiện môi trường có kiểm soát trong Conviron™ trong 1-2 tuần trước khi chuyển sang nhà kính.

Thực vật T₀ đã biến nạp được tự thụ phấn trong nhà kính để thu được hạt T₁. Các thực vật T₀ và con cháu T₁ được phun bằng thuốc diệt cỏ glyphosat ở khoảng nồng độ để thiết lập mức bảo vệ bởi gen *dgt-28*, *dgt-31*, *dgt-32*, hoặc *dgt-33*.

Ví dụ 22: Biến nạp cây thuốc lá bằng dgt-28

Các mảnh lá của cây thuốc lá (cv. Petit Havana) được biến nạp bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* chứa gen chuyển *dgt-28*. Các khuẩn lạc đơn chứa plasmit chứa gen chuyển *dgt-28* được gây nhiễm vào 4 ml môi trường YEP chứa spectinomycin (50 µg/ml) và streptomycin (125 µg/ml) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 28°C trên máy lắc

ở tốc độ 190 vòng/phút. 4 ml môi trường nuôi cấy hạt sau đó được sử dụng để gây nhiễm 25 ml môi trường nuôi cấy chứa cùng môi trường này trong bình Erlenmeyer có ngăn dung tích 125 ml. Môi trường nuôi cấy này được ủ ở nhiệt độ 28°C, lắc ở tốc độ 190 vòng/phút cho đến khi nó đạt đến OD₆₀₀ bằng ~1,2. Mười ml huyền phù *Agrobacterium* sau đó được đưa vào đĩa Petri™ vô trùng 60 x 20 mm.

Các mảnh lá mới cắt (0,5 cm²) từ các thực vật được phát triển vô trùng trên môi trường MS (Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS,) với 30 g/l sucroza trong PhytaTrays™ (Sigma, St. Louis, MO) được ngâm trong 10 ml môi trường nuôi cấy qua đêm của *Agrobacterium* trong vài phút, thấm khô trên giấy lọc vô trùng và sau đó được đặt lên trên cùng môi trường có bổ sung 1 mg/l axit indolaxetic và 1 mg/l 6-benzylamino purin. Ba ngày sau đó, các mảnh lá được trồng chung với *Agrobacterium* mang gen chuyển *dgt-28* được chuyển sang cùng môi trường có 5 mg/l Basta™ và 250 mg/l cephotaxime.

Sau 3 tuần, các cây non T₀ riêng được chuyển sang môi trường MS có 10 mg/l Basta™ và 250 mg/l cephotaxime 3 tuần nữa trước khi cấy sang đất và chuyển sang nhà kính. Các thực vật T₀ được chọn (như được nhận diện bằng quy trình phân tích phân tử đã mô tả trên đây) được cho tự thụ phấn và hạt được gom từ các quả nang khi chúng khô hoàn toàn. Cây con T₁ được sàng lọc về tình trạng tiếp hợp giao tử và sự biểu hiện gen chỉ thị (như được mô tả dưới đây) và các thực vật được chọn chứa gen chuyển *dgt-28* được nhận diện.

Các thực vật được chuyển vào nhà kính trước khi rửa thạch khỏi rễ, cấy vào đất trong các chậu hình vuông kích thước 13,75 cm, đặt chậu vào túi Ziploc® (SC Johnson & Son, Inc.), cho nước máy vào đáy của túi, và đặt dưới ánh sáng gián tiếp trong nhà kính 30°C trong một tuần. Sau 3-7 ngày, túi được mở; các thực vật được thụ phấn và để phát triển trong túi mở cho đến khi các thực vật được cho thích nghi với môi trường trong nhà kính, khi đó túi được loại bỏ. Các thực vật được trồng dưới các điều kiện trong nhà kính ẩm thông thường (ngày 27°C, đêm 24°C, ngày 16 giờ, tự nhiên tối thiểu + ánh sáng bổ sung = 1200 µE/m²s¹).

Trước khi nhân giống, các thực vật T₀ được lấy mẫu để phân tích ADN để xác định số bản sao *dgt-28* cài xen bằng PCR theo thời gian thực. Mô mới được đưa vào các ống và được đông khô ở nhiệt độ 4°C trong 2 ngày. Sau khi mô khô hoàn toàn, hạt vonfram

(Valenite) được đưa vào ống và các mẫu được đem nghiền khô trong 1 phút bằng cách sử dụng máy nghiền hạt Kelco. Tiếp theo tiến hành quy trình tách ADN DNeasy™ chuẩn (Qiagen, DNeasy 69109). Phần mẫu của ADN đã chiết sau đó được nhuộm bằng xanh Pico Green (Molecular Probes P7589) và đọc trong huỳnh quang kế (BioTek™) bằng các chuẩn đã biết để thu được nồng độ tính theo ng/μl. Tổng số 100 ng ADN toàn phần được sử dụng làm khuôn mẫu. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt Geneamp™ 9700 (Applied Biosystems), bằng cách đưa các mẫu đến nhiệt độ 94°C trong 3 phút và 35 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 64°C trong 30 giây, và 72°C trong 1 phút và 45 giây tiếp theo là 72°C trong 10 phút. Các sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarosa 1% được nhuộm bằng EtBr và được xác nhận bằng thăm tách Southern.

Năm đến chín các biến thể gen PCR dương có 1-3 bản sao của gen *dgt-28* từ 3 cấu trúc chứa trình tự peptit vận chuyển lục lạp khác nhau (TraP4, TraP8 và TraP23) được tái sinh và được chuyển sang nhà kính.

Tất cả các thực vật có PCR dương được lấy mẫu để định lượng protein DGT-28 bằng ELISA chuẩn. Protein DGT-28 được phát hiện trong tất cả các thực vật có PCR dương và xu hướng tăng nồng độ protein được lưu ý với số bản sao *dgt-28* tăng dần.

Mức di truyền *aad-12* (*v1*) ở cây thuốc lá

Thử nghiệm trên 100 thực vật con cháu được tiến hành trên năm dòng *dgt-28* T₁ trên mỗi cấu trúc. Các cấu trúc chứa một trong số các trình tự peptit vận chuyển lục lạp sau: TraP4, TraP8 hoặc TraP23. Các hạt được phân tầng, được gieo, và được cấy giống như quy trình *Arabidopsis* được nêu làm ví dụ trên đây, ngoại trừ các thực vật vô hiệu không được loại bỏ bởi chọn lọc ban đầu trước khi cấy. Sau đó, tất cả thực vật được phun bằng 280 g ae/ha IGNITE 280 SL để chọn lọc chất đánh dấu để chọn lọc *pat* như được mô tả ở trên. Sau 3 DAT, các thực vật có tính kháng và miễn cảm được đếm.

Bốn trong số năm dòng được thử nghiệm đối với mỗi cấu trúc được phân ly dưới dạng locut đơn, tính trạng Mendel nổi trội (3R:1S) như được xác định bằng phân tích khi bình phương. *Dgt-28* là gen kháng glyphosat có thể di truyền được trong nhiều loài.

Tính chống chịu thuốc diệt cỏ được đưa vào sau khi cây mọc ở cây thuốc lá T₁ được biến nạp bằng *dgt-28*. Các thực vật có tính kháng T₁ từ mỗi biến thể gen được sử dụng trong thử nghiệm ở con cháu được cho ký hiệu nhận dạng duy nhất và được lấy mẫu để phân tích tình trạng tiếp hợp giao tử của gen *dgt-28*. Dữ liệu tình trạng tiếp hợp

giao tử được sử dụng để gán 2 bản sao bán hợp tử và 2 bản sao đồng hợp tử cho mỗi mức glyphosat được dùng đối với tổng số 4 bản sao trên mỗi lần xử lý. Các thực vật này được so sánh đối với cây thuốc lá Petite havana kiểu đại. Tất cả các thực vật được phun bằng máy phun theo đường được thiết đặt ở 187 l/ha. Các thực vật này được phun DURANGO DMA™ với lượng nằm trong khoảng 560-4480 g ae/ha. Tất cả các lần dùng được pha chế trong nước bằng cách bổ sung 2% kl/tt amoni sulfat (AMS). Các thực vật được đánh giá ở 7 và 14 ngày sau khi xử lý. Các thực vật được xác định mức tổn thương đối với sự còi cọc, úa vàng, và hoại tử nhìn thấy được nói chung. Thế hệ T₁ đang phân ly, vì vậy một số đáp ứng dễ biến đổi được mong đợi do sự khác biệt về tình trạng tiếp hợp giao tử.

Các kết quả phun thể hiện ở 7 DAT (ngày sau khi xử lý) tổn thương sinh dưỡng tối thiểu với các mức glyphosat tăng được phát hiện (dữ liệu không được chỉ ra). Sau 14 DAT, dữ liệu tổn thương nhìn thấy được thể hiện tổn thương tăng với các biến thể gen có một bản sao của cấu trúc chứa TraP4 so với các biến thể gen có một bản sao từ các cấu trúc TraP8 và TraP23. Bảng 27.

Bảng 27. Ở mức 2240 g ae/ha glyphosat, tổn thương trung bình là 37,5% được thể hiện với biến thể gen chứa TraP4, trong đó các biến thể gen chứa TraP8 và TraP23 thể hiện tổn thương trung bình lần lượt là 9,3% và 9,5%.

TraP4:: <i>dgt-28</i> (pDAB107543)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	2	2	0	18,0	8,1	10-25
1120 g ae/ha	1	3	0	24,5	4,9	18-30
2240 g ae/ha	0	3	1	37,5	6,5	30-45
4480 g ae/ha	0	2	2	42,5	2,9	40-45
TraP8:: <i>dgt-28</i> (pDAB107545)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3,3	3,9	0-8
1120 g ae/ha	4	0	0	6,5	1,7	5-8
2240 g ae/ha	4	0	0	9,3	3,0	5-12

4480 g ae/ha	2	2	0	17,5	6,5	10-25
TraP23:: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	4	0	0	10,0	1,6	8-12
1120 g ae/ha	4	0	0	8,8	3,0	5-12
2240 g ae/ha	4	0	0	9,5	4,2	5-15
4480 g ae/ha	4	0	0	15,8	1,5	15-18
<i>Petite havana</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
560 g ae/ha	0	0	4	85,0	4,1	80-90
1120 g ae/ha	0	0	4	91,3	2,5	90-95
2240 g ae/ha	0	0	4	94,5	3,3	90-98
4480 g ae/ha	0	0	4	98,3	2,4	95-100

Các kết quả này thể hiện tính chống chịu của *dgt-28* lên đến 4480 g ae/ha glyphosat, cũng như sự khác biệt về tính chống chịu được tạo ra bởi các trình tự peptit vận chuyển lục lạp được liên kết với gen *dgt-28*.

Bảo vệ *dgt-28* chống lại các mức glyphosat tăng ở thế hệ T₂

Thử nghiệm trên 25 thực vật con cháu được tiến hành trên hai đến ba dòng *dgt-28* T₂ trên mỗi cấu trúc. Các dòng đồng hợp tử được chọn dựa trên phân tích tình trạng tiếp hợp giao tử được hoàn thành ở thế hệ trước. Các hạt được phân tầng, gieo, và cấy như được mô tả trước. Sau đó, tất cả thực vật được phun bằng 280 g ae/ha Ignite 280 SL để chọn lọc chất đánh dấu để chọn lọc *pat* như được mô tả ở trên. Sau 3 DAT, các thực vật có tính kháng và miễn cảm được đếm. Tất cả các dòng được thử nghiệm đối với mỗi cấu trúc không phân ly từ đó xác nhận các dòng đồng nhất ở thế hệ T₂ và thể hiện sự di truyền theo thuyết Mendel qua ít nhất hai thế hệ *dgt-28* ở cây thuốc lá.

Các mức DMA™ DURANGO nằm trong khoảng 420-3360 g ae/ha glyphosat được đưa vào cây thuốc lá có 2-3 lá như được mô tả ở trên. Dữ liệu tổn thương nhìn thấy được 14 DAT xác nhận các kết quả tính chống chịu được thể hiện ở thế hệ T₁. Các kết quả về

lá từ dòng có hai bản sao từ cấu trúc chứa TraP4 thể hiện tính chống chịu tương tự với kết quả của các dòng TraP8 và TraP23 có một bản sao (dữ liệu không được chỉ ra).

Bảng 28. Các dòng có một bản sao từ cấu trúc chứa TraP4 có *dgt-28* thể hiện tổn thương tăng so với các dòng từ các cấu trúc chứa TraP8 và TraP23 có *dgt-28*.

TraP4:: <i>dgt-28</i> (pDAB107543)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	0	4	0	23,8	4,8	20-30
840 g ae/ha	0	4	0	30,0	4,1	25-35
1680 g ae/ha	0	4	0	35,0	5,8	30-40
3360 g ae/ha	0	4	0	31,3	2,5	30-35
TraP8:: <i>dgt-28</i> (pDAB107545)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha	4	0	0	2,5	2,9	0-5
1680 g ae/ha	4	0	0	9,3	3,4	5-12
3360 g ae/ha	4	0	0	10,5	1,0	10-12
TraP23:: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha	4	0	0	6,3	2,5	5-10
1680 g ae/ha	4	0	0	10,0	0,0	10
3360 g ae/ha	3	1	0	13,8	4,8	10-20
<i>Petite havana</i>	% tổn thương			% tổn thương		
Mức dùng	<20 %	20-40 %	>40 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
0 g ae/ha glyphosat	4	0	0	0,0	0,0	0

420 g ae/ha	0	0	4	95,0	0,0	95
840 g ae/ha	0	0	4	98,8	1,0	98-100
1680 g ae/ha	0	0	4	99,5	1,0	98-100
3360 g ae/ha	0	0	4	100	0,0	100

Dữ liệu này thể hiện tính chống chịu mạnh của cây thuốc lá *dgt-28* lên đến 3360 g ae/ha glyphosat qua hai thế hệ so với đối chứng không được biến nạp.

Các thực vật được chọn từ mỗi biến thể gen được lấy mẫu trước khi dùng glyphosat để phân tích protein DGT-28 bằng ELISA DGT-28 chuẩn. Dữ liệu thể hiện mức biểu hiện protein trung bình DGT-28 của các dòng đơn giản (1-2 bản sao) qua các cấu trúc nằm trong khoảng từ 72,8-114,5 ng/cm². Dữ liệu thể hiện *dgt-28* biểu hiện protein ở thế hệ T₂ của cây thuốc lá được biến nạp và dữ liệu về tính chống chịu xác nhận protein DGT-28 chức năng.

Xếp chồng *dgt-28* để làm tăng phổ diệt cỏ ở cây thuốc lá (cv. Petit Havana)

Các thực vật *dgt-28* đồng hợp tử (pDAB107543 và pDAB107545) và *aad-12 v1* (pDAB3278) (xem PCT/US2006/042133 đối với gen đề cập sau), cả hai được lai lẫn nhau và hạt F₁ được thu lại. Hạt F₁ từ hai con lai lẫn nhau của mỗi gen được phân tầng và xử lý, 6 bản sao của mỗi con lai được xử lý bằng 1120 g ae/ha glyphosat (chọn lọc đối với gen *dgt-28*), 1120 g ae/ha 2,4-D (chọn lọc đối với gen *aad-12*), hoặc hỗn hợp trộn trong thùng của hai thuốc diệt cỏ này ở các mức được mô tả. Các thực vật được phân loại ở 14 DAT. Các kết quả phun được thể hiện trong Bảng 29.

Bảng 29. Đáp ứng của *aad-12* và *dgt-28* F₁

	<i>aad-12</i> x TraP4:: <i>dgt-28</i>	<i>aad-12</i> x TraP8:: <i>dgt-28</i>	<i>Petite</i> <i>havana</i>
Mức dùng	Tính chống chịu		
1120 g ae/ha 2,4-D	++++	++++	-
1120 g ae/ha glyphosat	++	++	-
1120 g ae/ha 2,4-D + 1120 g ae/ha glyphosat	++	++	-

Các kết quả này xác nhận rằng *dgt-28* có thể được xếp chồng thành công với *aad-12 (v1)*, do đó làm tăng phổ diệt cỏ có thể được dùng cho cây trồng cần quan tâm (glyphosat + axit phenoxyaxetic lần lượt đối với *dgt-28* và *aad-12*). Trong quá trình sản

xuất cây trồng trong đó khó phòng trừ các cỏ dại lá rộng hoặc tồn tại các biotyp cỏ dại kháng thì việc xếp chồng có thể được sử dụng như là cách phòng trừ cỏ dại và bảo vệ cây trồng cần quan tâm. Các tính trạng đầu vào hoặc đầu ra bổ sung cũng có thể được xếp chồng với gen *dgt-28*.

Ví dụ 23: Tính kháng glyphosat ở cây lúa mì

Sản xuất các vector kép mã hóa DGT-28

Các vector kép chứa băng biểu hiện DGT-28 và chọn lọc PAT được thiết kế và lắp ráp bằng các kỹ năng và kỹ thuật đã biết phổ biến trong lĩnh vực này. Mỗi băng biểu hiện DGT-28 chứa trình tự khởi động, vùng không được dịch mã 5' và intron từ gen Ubiquitin (*Ubi*) từ *Zea mays* (Toki et al Plant Physiology 1992, 100 1503-07), tiếp theo là trình tự mã hóa bao gồm một trong bốn peptit vận chuyển (TraP4, TraP8, TraP23 hoặc TraP5) được dung hợp với đầu 5' của phiên bản tổng hợp của gen 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (DGT-28), được tối ưu hóa về codon để biểu hiện ở thực vật. Băng biểu hiện DGT-28 được kết thúc bởi vùng không được dịch mã (UTR) 3' bao gồm vùng kết thúc phiên mã và vị trí polyadenyl hóa của gen lipaza (*Vp1*) từ *Z. mays* (Paek et al., *Mol Cells* 1998 30;8(3) 336-42). Băng chọn lọc PAT bao gồm trình tự khởi động, vùng không được dịch mã 5' và intron từ gen Actin (*Act1*) từ *Oryza sativa* (McElroy et al., *The Plant Cell* 1990 2(2) 163-171), tiếp theo là phiên bản tổng hợp của gen phosphinothrixin axetyl transferaza (PAT) được phân lập từ *Streptomyces viridochromogenes*, được tối ưu hóa về codon để biểu hiện ở thực vật. Gen PAT mã hoá protein truyền tính kháng cho các chất ức chế glutamin syntetaza bao gồm phosphinothricin, glufosinat, và bialaphos (Wohlleben et al *Gene* 1988, 70(1), 25-37). Băng chọn lọc được kết thúc bằng 3' UTR bao gồm vùng kết thúc phiên mã và vị trí polyadenyl hóa từ gen 35s của virus gây bệnh khảm trên súp lơ (CaMV) (Chenault et al *Plant Physiology* 1993 101 (4), 1395-1396).

Băng chọn lọc được tổng hợp bởi nhà cung cấp tổng hợp gen thương mại (GeneArt, Life Technologies) và tách dòng vào vector kép được hoạt hóa bởi Gateway. Các băng biểu hiện DGT-28 được tách dòng phụ vào pDONR221. Dòng vô tính ENTRY thu được được sử dụng trong phản ứng LR Clonaza II (Invitrogen, Life Technologies) với vector kép được hoạt hóa bởi Gateway mã hóa băng biểu hiện phosphinothrixin axetyl transferaza (PAT). Các khuẩn lạc của tất cả các plasmit được lắp ráp được sàng lọc ban đầu bằng cách phân cắt giới hạn ADN đã tinh chế bằng cách sử dụng endonucleaza giới

hạn thu được từ New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) và Promega (Promega Corporation, WI). Việc điều chế ADN plasmit được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit QIAprep *Spin Miniprep* (Qiagen, Hilden) hoặc Pure Yield Plasmid Maxiprep System (Promega Corporation, WI), theo chỉ dẫn của nhà cung cấp. ADN plasmit của các dòng vô tính được chọn được giải trình tự bằng cách sử dụng quy trình giải trình tự vòng ABI Sanger Sequencing and Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies). Dữ liệu trình tự được lắp ráp và phân tích bằng cách sử dụng phần mềm SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation., Ann Arbor, MI).

Bốn dòng vô tính biểu hiện kép thu được: pDAS000122 (TraP4-DGT28), pDAS000123 (TraP8-DGT28), pDAS000124 (TraP23-DGT28) và pDAS000125 (TraP5-DGT28), mỗi dòng được biến nạp vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Sản xuất các biến thể gen của cây lúa mì chuyển gen bằng cấu trúc biểu hiện *dgt-28*

Các cây lúa mì chuyển gen biểu hiện một trong số bốn cấu trúc biểu hiện DGT-28 được tạo ra bằng cách biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* sử dụng dòng cây lúa mì cho Bobwhite MPB26RH, theo quy trình tương tự như của Wu et al. Transgenic Research 2008, 17:425-436. Các biến thể gen chuyển gen T0 giả định được chọn về tính chống chịu phosphinothrixin (PPT), kiểu hình được tạo ra bởi chất đánh dấu dễ chọn lọc PAT, và được chuyển sang đất. Các thực vật T0 này được trồng dưới các điều kiện trong nhà kính và hạt T1 được tạo ra. Nói chung, khoảng 45 biến thể gen T0 độc lập được tạo ra đối với mỗi cấu trúc biểu hiện DGT-28.

Tính kháng glyphosat của các biến thể gen lúa mì *dgt-28* của cây lúa mì T₀

Các biến thể gen T₀ được cho thích nghi với môi trường trong nhà kính và được phát triển đến 2-4 lá trông mới, bình thường mọc ra từ vòng lá (tức là các thực vật được chuyển tiếp từ môi trường nuôi cấy mô sang điều kiện trồng trong nhà kính). Các thực vật được phát triển ở nhiệt độ 25°C dưới 12 giờ chiếu sáng bổ sung trong nhà kính cho đến hạn. Việc sàng lọc ban đầu tính chống chịu glyphosat và phân tích Taqman được hoàn thành trên các thực vật T₁ được trồng dưới cùng điều kiện như được mô tả ở trên. Dữ liệu cho phép xác định các biến thể gen T₁ có thể di truyền được được mô tả đặc trưng tiếp. Sáu biến thể gen T₁ có số bản sao thấp (1-2 bản sao) và hai biến thể gen T₁ có nhiều bản sao được trồng lại dưới các điều kiện trong nhà kính và được phát triển đến

giai đoạn 3 lá. Các thực vật T_1 được phun bằng chế phẩm glyphosat thương mại (Durango DMATM) với lượng nằm trong khoảng 420 - 3360 g ae/ha, có khả năng gây tổn thương đáng kể cho các dòng lúa mì không được biến nạp. Việc bổ sung 2% khối lượng/thể tích amoni sulfat được bao gồm trong việc dùng này. Liều gây chết được xác định là mức độ gây ra >75% tổn thương cho đối chứng không được biến nạp Bob White MPB26RH. Thuốc diệt cỏ được đưa vào.

Trong ví dụ này, việc ứng dụng glyphosat được áp dụng để xác định sự phân ly của gen *dgt-28* ở thế hệ T_1 cũng như để chứng minh tính chống chịu với các hàm lượng glyphosat tăng dần. Đáp ứng của các thực vật được thể hiện xét về mặt tỉ lệ tổn thương nhìn thấy được 21 ngày sau khi xử lý (DAT). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng đồ thị của các cá thể biểu hiện mức tổn thương nhìn thấy được nhỏ hơn 25% (4), mức tổn thương nhìn thấy được nằm trong khoảng 25%-50% (3), mức tổn thương nhìn thấy được nằm trong khoảng 50%-75% (2) và mức tổn thương lớn hơn 75% (1). Số trung bình cộng và độ lệch chuẩn được thể hiện đối với mỗi cấu trúc được sử dụng để biến nạp cây lúa mì. Khoảng tính điểm của đáp ứng riêng cũng được thể hiện ở cột cuối cùng đối với mỗi mức và lần biến nạp. Cây lúa mì kiểu dại, không được biến nạp (c.v. Bob White MPB26RH) được dùng làm đối chứng miễn cảm glyphosat. Ở thế hệ T_1 , các thực vật bán hợp tử và đồng hợp tử được dùng để thử nghiệm đối với mỗi biến thể gen, và do đó được bao gồm đối với mỗi mức glyphosat được thử nghiệm. Các thực vật bán hợp tử sẽ chứa một nửa liều của gen của các thực vật đồng hợp tử, do đó tính biến đổi của đáp ứng với glyphosat có thể được mong đợi ở thế hệ T_1 .

Các kết quả của các cây lúa mì *dgt-28* T_1 thể hiện rằng tính chống chịu với glyphosat đạt được ở các mức lên đến 3360 g ae/ha với các peptit vận chuyển lục lạp TraP4, TraP5, TraP8 và TraP23. Bảng 30. Dữ liệu là biến thể gen T_1 có số bản sao thấp nhưng là điển hình của quần thể đối với mỗi cấu trúc.

Bảng 30. Đáp ứng của các biến thể gen cây lúa mì *dgt-28* T_1 có số bản sao thấp với glyphosat 21 ngày sau khi xử lý.

TraP4:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương				% tổn thương		
Mức dùng	<25 %	25-50 %	50-75 %	>75 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
420 g ae/ha	5	0	0	0	4,00	0,00	4

840 g ae/ha	6	2	0	0	3,75	0,46	3-4
1680 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3-4
3360 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3-4
TraP8:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương				% tổn thương		
Mức dùng	<25 %	25-50 %	50-75 %	>75 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
420 g ae/ha	5	3	0	0	3,63	0,52	3-4
840 g ae/ha	3	5	0	0	3,38	0,52	3-4
1680 g ae/ha	4	3	0	0	3,57	0,53	3-4
3360 g ae/ha	5	5	0	0	3,50	0,53	3-4
TraP23:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương				% tổn thương		
Mức dùng	<25 %	25-50 %	50-75 %	>75 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
420 g ae/ha	9	2	0	0	3,82	0,40	3-4
840 g ae/ha	8	1	0	0	3,89	0,33	3-4
1680 g ae/ha	7	5	0	0	3,58	0,0	3-4
3360 g ae/ha	8	2	0	0	3,80	4,8	3-4
TraP5:: <i>dgt-28</i>	% tổn thương				% tổn thương		
Mức dùng	<25 %	25-50 %	50-75 %	>75 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
420 g ae/ha	5	2	0	0	3,71	0,49	3-4
840 g ae/ha	4	2	0	0	3,67	0,52	3-4
1680 g ae/ha	7	3	0	0	3,70	0,48	3-4
3360 g ae/ha	6	0	0	0	4,00	0,00	3-4
Bobwhite MPB26RH	% tổn thương				% tổn thương		
Mức dùng	<25 %	25-50 %	50-75 %	>75 %	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Khoảng (%)
420 g ae/ha	0	1	1	10	1,25	0,62	1-3
840 g ae/ha	0	0	0	10	1,00	0,00	1
1680 g ae/ha	0	0	0	12	1,17	0,58	1-3
3360 g ae/ha	0	0	0	10	1,00	0,00	1

Ở 21 DAT, các thực vật kháng và mẫn cảm được đếm để xác định tỉ lệ phần trăm các dòng phân ly dưới dạng locut đơn, tính trạng Mendel nổi trội (3R:1S) (3 kháng: 1 mẫn cảm) như được xác định bằng phân tích khi bình phương. Bảng 31. Dữ liệu này

chứng tỏ rằng *dgt-28* có thể di truyền dưới dạng gen kháng glyphosat mạnh ở loài một lá mầm.

Bảng 31. Tỷ lệ phần trăm của các biến thể gen *dgt-28* T₁ theo cấu trúc thể hiện tính di truyền theo kiểu Mendel dựa trên việc chọn lọc glyphosat ở các mức nằm trong khoảng từ 420-3360 g ae/ha.

ID cấu trúc	CTP:GOI	% biến thể gen T ₁ được thử nghiệm được phân ly ở locut đơn	% biến thể gen T ₁ được thử nghiệm được phân ly làm 2 locut	Số biến thể gen T ₁ được thử nghiệm
pDAS000122	TraP4:: <i>dgt-28</i>	62,5%	37,5%	8
pDAS000123	TraP8:: <i>dgt-28</i>	87,5%	12,5%	8
pDAS000124	TraP23:: <i>dgt-28</i>	12,5%	87,5%	8
pDAS000125	TraP5:: <i>dgt-28</i>	62,5%	0,0%	8

Xác nhận phân tử của thực vật chuyển gen T₀ để hợp nhất các T-ADN mã hóa DGT-28

ADN hệ gen được tách từ vật liệu lá được đông khô của tất cả các cây lúa mì T₀ giả định. Mô lá mới được thu hoạch được đông lạnh nhanh trong nitơ lỏng và đông khô trong 24 giờ trong Labconco Freezone 4.5® (Labconco, Kansas City, MO) ở nhiệt độ -40°C và áp suất 133×10^{-3} mBar. Nguyên liệu đã đông khô được đem chiết ADN bằng cách sử dụng bộ kit DNeasy® Plant DNA Extraction Mini (Qiagen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

ADN từ mỗi thực vật T₀ được thử nghiệm đối với sự có mặt-vắng mặt của chủng mang *Agrobacterium tumefaciens* và đối với số lượng bản sao được hợp nhất của T-ADN mã hóa DGT-28. Sự có mặt-vắng mặt của chủng *A. tumefaciens* được thực hiện sử dụng thử nghiệm qPCR Taqman® duplex để khuếch đại gen ubiquitin nội sinh (các môi xuôi và ngược và đoạn dò:

5' GCGAAGATCCAGGACAAGGA 3' (SEQ ID NO:85; môi xuôi)

5' CTGCTTACCGGCAAAGATGAG 3' (SEQ ID NO:86; môi ngược)

5' TTCCCCCGGACCAGCAGCGT 3' (SEQ ID NO:87; đoạn dò)

từ hệ gen lúa mì, và virC từ pTiBo542:

5' CCGACGAGAAAGACCAGCAA 3' (SEQ ID NO:88; môi xuôi)

5' CTTAAGTTGTCGATCGGGACTGT 3' (SEQ ID NO:89; mỗi ngược)

5' TGAGCCTCTCGTCGCCGATCACAT 3' (SEQ ID NO:90; đoạn dò).

Số lượng bản sao T-ADN được hợp nhất được ước tính bằng cách sử dụng thử nghiệm qPCR Taqman® duplex theo quy trình của Livak and Schmittgen (Methods 2001 25:402-8). Thử nghiệm này khuếch đại gen puroindoline-b (*Pinb*) nội sinh có một bản sao trong hệ gen D của cây lúa mì lục bội (Gautier et al Plant Science 2000 153, 81–91):

5' ATTTTCCATTCACTTGGCCC 3' (SEQ ID NO:91; mỗi xuôi)

5' TGCTATCTGGCTCAGCTGC 3' (SEQ ID NO:92; mỗi ngược)

5' ATGGTGGAAGGGCGGTTGTGA 3' (SEQ ID NO:93; đoạn dò)

và vùng của trình tự khởi động Actin (*Act1*) có mặt trên T-ADN:

5' CTCCCGCGCACCGATCTG 3' (SEQ ID NO:94; mỗi xuôi)

5' CCCGCCCCTCTCCTCTTTC 3' (SEQ ID NO:95; mỗi ngược)

5' AAGCCGCCTCTCGCCCACCCA 3' (SEQ ID NO:96; đoạn dò).

Các thực vật không khuếch đại sản phẩm từ *virC* và từ đó hiệu chỉnh các sản phẩm được khuếch đại bằng các đoạn mồi của ubiquitin nội sinh và trình tự khởi động actin của cây lúa được phân loại là chuyển gen. Số lượng T-ADN được hợp nhất được ước tính từ 2SYMBOL 68 \f "Symbol" \s 13Δc(T), theo Livak and Schmittgen (Methods 2001 25:402-8). Nói chung, khoảng 95% trong số tất cả các thực vật T0 có ít nhất một bản sao được hợp nhất của T-ADN. Bảng 32.

Bảng 32. Số thực vật T₀ độc lập được tạo ra và ước tính số T-ADN được hợp nhất mã hóa DGT-28.

Vector	# Thực vật T ₀ độc lập được thử nghiệm	# Biến thể gen T ₀ độc lập có khả năng gen chuyển	# Biến thể gen T-ADN có nhiều bản sao (≥4)	# Biến thể gen T-ADN có ít bản sao (≥3)
pDAS000122	45	43	15	28
pDAS000123	44	42	11	31
pDAS000124	45	44	21	23
pDAS000125	46	39	15	24

Nghiên cứu thử nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử PCR để theo dõi sự di truyền của gen chuyển

Các trình tự nằm bên sườn vị trí hợp nhất T-ADN được nhận diện bằng cách phân cắt ADN hệ gen đã tinh chế với tám endonucleaza giới hạn, tiếp theo nối các đoạn thích ứng sợi kép đặc hiệu với các phần nhô ra được tạo ra bởi endonucleaza giới hạn. Sau khi nối đoạn thích ứng, PCR được thực hiện với đoạn mồi được biotin hóa của đầu 3' hoặc 5' của T-ADN mã hóa DGT-28 và đoạn mồi của mỗi đoạn thích ứng. Các sản phẩm PCR được ghi nhận và tinh chế trên các hạt Ampure Solid Phase Reversible Immobilization (SPRI) (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company). Sau đó, nested PCR (PCR được lồng) được thực hiện và các sản phẩm khuếch đại được sắp xếp trình tự Sanger bằng cách sử dụng BigDye® v3.1 chemistry (Applied Biosystems) trên nền điện di mao quản tự động hóa ABI3730xl®. Việc phân tích trình tự được thực hiện sử dụng phần mềm Sequencher (GeneCodes, Ann Arbor, MI) được sử dụng để tạo ra (nếu có thể) trình tự liên ứng. Trình tự liên ứng thu được và các singleton được sử dụng dưới dạng truy vấn BlastN đối với trình tự thăm dò hệ gen được lắp ráp liền kề đối với các nhánh nhiễm sắc thể được phân dòng của thứ lúa mì Chinese Spring (www.wheatgenome.org) để xác định nhiễm sắc thể trong đó sự hợp nhất T-ADN xảy ra và cho phép thiết kế các đoạn mồi đặc hiệu hệ gen phụ để nghiên cứu thử nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử PCR.

Hai thử nghiệm PCR được nghiên cứu đối với mỗi biến thể gen chuyển gen để sự di truyền gen chuyển có thể được theo dõi ở thế hệ tiếp theo. Thử nghiệm thứ nhất (dưới đây được gọi là PCR ngoài-ngoài) được thiết kế để khuếch đại qua vị trí hợp nhất T-ADN. Sự khuếch đại đặc hiệu hệ gen phụ trong thử nghiệm này đạt được bằng cách sử dụng PCR bật-tắt (PCR on-off) với các đoạn mồi được thiết kế cho vị trí bazơ giáp cuối (chứa liên kết phosphothioat) qua sự biến đổi trình tự nucleotit phân biệt locut đích từ các bản sao được nhân đôi (cả tương đồng và đồng đẳng) của locut ở đầu đó nữa trong hệ gen cây lúa mì. Thử nghiệm thứ hai (dưới đây được gọi là PCR trong-ngoài) được thiết kế để khuếch đại từ T-ADN vào trình tự nội sinh. Thử nghiệm này sử dụng một trong số các đoạn mồi từ thử nghiệm PCR ngoài-ngoài và đoạn mồi được thiết kế cho đầu 3' hoặc 5' của các T-ADN mã hóa DGT-28. Các đoạn mồi PCR được thiết kế có chiều dài từ 18 đến 27 nucleotit và có nhiệt độ chảy nằm trong khoảng từ 60 đến 65°C, tối ưu là 63°C. Cả hai thử nghiệm PCR ngoài-ngoài và trong-ngoài được thực hiện trong thể tích phản ứng 25 µl với 0,2mM dNTP, dung dịch đệm 1x Phusion PCR (New England BioLabs),

1,5 mM MgCl₂, 0,5U Hotstart Phusion ADN polymeraza (New England BioLabs), 25 ng ADN hệ gen đã tinh chế và 0,4 µM mỗi đoạn mồi. Các điều kiện quay vòng PCR là 98°C trong 30 giây sau đó (98°C trong 10 giây, 65°C trong 20 giây, 72°C trong 60 giây) trong 40 chu kỳ. Tình trạng tiếp hợp giao tử của các thực vật chuyển gen được định như được thể hiện trong bảng 33.

Bảng 33. Các biến thể gen chuyển gen đang được nghiên cứu bằng thử nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử PCR và các trình tự đoạn mồi được sử dụng để PCR ngoài-ngoài (out-out) và trong-ngoài (in-out).

PCR ngoài-ngoài				
Cấu trúc	Mã biến thể gen	Đoạn mồi 1 (5'→3')*	Đoạn mồi 2 (5'→3')*	Kích thước (bp)
pDAS000 122	hh08-667 8-2-1	GGTTTGTGAATCCCT CTGTTGG*T (SEQ ID NO:97)	GTGGTCATGACAGT ATGATAACAG*G (SEQ ID NO:98)	303
pDAS000 122	hh08-667 8-8-1	GGGTCTGCCCAATGAA GCG*A (SEQ ID NO:99)	TCTCGCTTCTCTCAT AACACATCGT*G (SEQ ID NO:100)	217
pDAS000 123	hh08-672 9-5-1	GACCTCTCTCACCCCTC CTCCT*C (SEQ ID NO:101)	CCAAATAATAAGTG AGAGAGGGGCA*T (SEQ ID NO:102)	286
pDAS000 123	mp45-67 39-14-1	TAGTTCCCCTGTTCGTG TGCAA*A (SEQ ID NO:103)	CAACAGCAGCCTCA CCAATCA*C (SEQ ID NO:104)	555
pDAS000 123	mp45-67 39-5-1	CAAGAACGGTGCTCCT TTTTAA*G (SEQ ID NO:105)	AGCCCTTCCTCTGC ATCCTT*A (SEQ ID NO:106)	440
pDAS000 124	yl02-676 2-8-1	GGCTGTGTTGCACACA AATAGAG*A (SEQ ID NO:107)	CAGCAGCACGGTAG GTAGATTG*T (SEQ ID NO:108)	473
pDAS000 124	gt19-675 2-4-1	CCGATAAGACGGCAA CTGATTAA*A (SEQ ID NO:109)	AGGCTGGCTTCTAG TGGAAGGA*G (SEQ ID NO:110)	215
pDAS000 124	hh08-676 1-1-1	GGGTTTCCGGCTGGAG AC*G (SEQ ID NO:111)	CCAAAAGCAATTTT CGTTATAAGATGC* C (SEQ ID NO:112)	302
OlipDAS 000124	yl02-676 2-6-1	CCAGATAATCTGTGGG CTCCT*G (SEQ ID NO:113)	GCAGCAGCTTGCCT TAAGC*A (SEQ ID NO:114)	161
pDAS000 125	hh08-678 0-10-1	TGCTTGTTTCTGTTGTC ATCATAGGT*T (SEQ ID NO:115)	CATTTGTTGGGTTTC CACGTAC*G (SEQ ID NO:116)	145
pDAS000	hh08-678	GAGCGCGGCTAAAGG	CCGATTTACATGGA	241

125	0-8-1	TCAAAA*C (SEQ ID NO:117)	CTTGATGGAG*T (SEQ ID NO:118)	
PCR trong-ngoài				
pDAS000 122	hh08-667 8-2-1	GGTTTGTGAATCCCT CTGTTGG*T (SEQ ID NO:119)	GCCGCCTCCAGTGA GTGTTGCTGCTTGT GTA*G (SEQ ID NO:120)	732
pDAS000 122	hh08-667 8-8-1	GGGTCTGCCCAATGAA GCG*A (SEQ ID NO:121)	GCCGCCTCCATAAT GTGTGAGTAGTTCC CAGATAAG*G (SEQ ID NO:122)	297
pDAS000 123	hh08-672 9-5-1	GCCGCCTCCAGTGAGT GTTGCTGCTTGTGTA* G (SEQ ID NO:123)	CCAAATAATAAGTG AGAGAGGGGCA*T (SEQ ID NO:124)	510
pDAS000 123	mp45-67 39-14-1	GCCGCCTCCATAATGT GTGAGTAGTTCCCAGA TAAG*G (SEQ ID NO:125)	CAACAGCAGCCTCA CCAATCA*C (SEQ ID NO:126)	510
pDAS000 123	mp45-67 39-5-1	GCCGCCTCCATAATGT GTGAGTAGTTCCCAGA TAAG*G (SEQ ID NO:127)	AGCCCTTCCTCTGC ATCCTT*A (SEQ ID NO:128)	580
pDAS000 124	yl02-676 2-8-1	GCCGCCTCCATAATGT GTGAGTAGTTCCCAGA TAAG*G (SEQ ID NO:129)	CAGCAGCACGGTAG GTAGATTG*T (SEQ ID NO:130)	672
pDAS000 124	gt19-675 2-4-1	GCCGCCTCCAGTGAGT GTTGCTGCTTGTGTA* G (SEQ ID NO:131)	AGGCTGGCTTCTAG TGGAAGGA*G (SEQ ID NO:132)	594
pDAS000 124	hh08-676 1-1-1	GCCGCCTCCATAATGT GTGAGTAGTTCCCAGA TAAG*G (SEQ ID NO:133)	CCAAAAGCAATTTT CGTTATAAGATGC* C (SEQ ID NO:134)	528
pDAS000 124	yl02-676 2-6-1	GCCGCCTCCAGTGAGT GTTGCTGCTTGTGTA* G (SEQ ID NO:135)	GCAGCAGCTTGCCT TAAGC*A (SEQ ID NO:136)	633
pDAS000 125	hh08-678 0-10-1	GCCGCCTCCATAATGT GTGAGTAGTTCCCAGA TAAG*G (SEQ ID NO:137)	CATTTGTTGGGTTTC CACGTAC*G (SEQ ID NO:138)	280
pDAS000 125	hh08-678 0-8-1	GCCGCCTCCAGTGAGT GTTGCTGCTTGTGTA* G (SEQ ID NO:139)	CCGATTACATGGA CTTGATGGAG*T (SEQ ID NO:140)	680

*biểu thị liên kết phosphothioat

Đánh giá kiểu hình của các thực vật chuyển gen T₁ về tính chống chịu glyphosat

Để xác định xem các biến thể gen chuyển gen có cấu trúc biểu hiện DGT-28 có thể hiện tính chống chịu glyphosat hay không, các thực vật T1 có nguồn gốc từ các biến thể gen riêng rẽ được đánh giá về kiểu hình trong điều kiện trồng trong nhà kính. Hai sàng lọc về kiểu hình được thực hiện. Trong sàng lọc thứ nhất (sơ bộ), các biến thể gen chuyển gen (với hạt T₁ đủ cho cả hai sàng lọc kiểu hình) được đánh giá về tính chống chịu với glufosinat và glyphosat để xác nhận sự biểu hiện DGT-28 và để thiết lập thứ hạng về tính chống chịu thuốc diệt cỏ trong số các biến thể gen. Trong sàng lọc thứ hai (chi tiết), các biến thể gen chuyển gen được chọn được đánh giá về tính chống chịu glyphosat ở các mức liều phun khác nhau để thiết lập mức độ tính chống chịu thuốc diệt cỏ được tạo ra trong các biến thể gen và giữa các cấu trúc biểu hiện DGT-28.

Mười hai hạt T1 trên mỗi biến thể gen được chọn và ba bản sao (12 hạt mỗi bản sao) của cây lúa mì thể cho không được biến nạp dòng Bobwhite MPB26RH được gieo trong các chậu kích thước 85 mm và được phát triển đến giai đoạn 2 lá trong điều kiện tưới đủ nước ở nhiệt độ 25°C với ánh sáng bổ sung tạo ra chu kỳ sáng 12 giờ. Các chậu được đặt trong thiết kế ngẫu nhiên để cho phép các ảnh hưởng của môi trường được loại bỏ trong khi phân tích dữ liệu. Các biến thể gen chuyển gen được sàng lọc được liệt kê trong Bảng 34. Ở giai đoạn 2 lá, tất cả các thực vật T1 và bản sao thứ nhất gồm 12 cây lúa mì thể cho không được biến nạp được phun bằng glufosinat ở mức liều bằng 420 g ai/ha. Các thực vật được kiểm tra bằng mắt thường sau bốn ngày và các thực vật điển hình có khoảng đáp ứng kiểu hình được sử dụng để xây dựng thang tính điểm từ 0 đến 6. Bảng 35.

Bảng 34. Các biến thể gen chuyển gen được thử nghiệm trong sàng lọc sơ bộ.

Mục	Vector	Mã biến thể gen	Số T-ADN ước lượng được hợp nhất mã hóa DGT-28*
1	pDAS000122	hh08-6678-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
2	pDAS000122	mp45-6696-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
3	pDAS000122	hh08-6718-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
4	pDAS000122	km51-6686-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
5	pDAS000122	mp45-6677-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
6	pDAS000122	mp45-6696-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
7	pDAS000122	mp45-6711-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
8	pDAS000122	mp45-6711-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
9	pDAS000122	hh08-6678-7-1	Biến thể gen có ít bản sao

Mục	Vector	Mã biến thể gen	Số T-ADN ước lượng được hợp nhất mã hóa DGT-28*
10	pDAS000122	mp45-6711-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
11	pDAS000122	mp45-6711-3-1	Biến thể gen có ít bản sao
12	pDAS000122	hh08-6678-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
13	pDAS000122	mp45-6711-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
14	pDAS000122	mp45-6711-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
15	pDAS000122	mp45-6696-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
16	pDAS000122	hh08-6678-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
17	pDAS000122	gt19-6680-3-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
18	pDAS000122	mp45-6711-10-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
19	pDAS000122	mp45-6711-31-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
20	pDAS000122	yl02-6709-1-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
21	pDAS000122	mp45-6711-11-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
22	pDAS000123	hh08-6729-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
23	pDAS000123	mp45-6739-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
24	pDAS000123	gt19-6733-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
25	pDAS000123	mp45-6739-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
26	pDAS000123	gt19-6733-9-1	Biến thể gen có ít bản sao
27	pDAS000123	gt19-6733-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
28	pDAS000123	yl02-6735-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
29	pDAS000123	yl02-6735-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
30	pDAS000123	hh08-6729-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
31	pDAS000123	gt19-6733-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
32	pDAS000123	mp45-6739-14-1	Biến thể gen có ít bản sao
33	pDAS000123	mp45-6739-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
34	pDAS000123	hh08-6729-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
35	pDAS000123	mp45-6739-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
36	pDAS000123	hh08-6729-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
37	pDAS000123	hh08-6729-9-1	Biến thể gen có ít bản sao
38	pDAS000123	gt19-6733-10-1	Biến thể gen có ít bản sao
39	pDAS000123	gt19-6733-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
40	pDAS000123	hh08-6729-3-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
41	pDAS000123	mp45-6739-16-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
42	pDAS000123	gt19-6733-6-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
43	pDAS000123	di01-6745-1-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
44	pDAS000123	gt19-6733-1-1	Biến thể gen có nhiều bản sao

Mục	Vector	Mã biến thể gen	Số T-ADN ước lượng được hợp nhất mã hóa DGT-28*
45	pDAS000123	mp45-6739-1-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
46	pDAS000124	mp45-6756-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
47	pDAS000124	yl02-6762-3-1	Biến thể gen có ít bản sao
48	pDAS000124	yl02-6762-11-1	Biến thể gen có ít bản sao
49	pDAS000124	gt19-6752-10-1	Biến thể gen có ít bản sao
50	pDAS000124	gt19-6752-14-1	Biến thể gen có ít bản sao
51	pDAS000124	yl02-6762-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
52	pDAS000124	mp45-6756-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
53	pDAS000124	mp45-6756-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
54	pDAS000124	yl02-6762-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
55	pDAS000124	yl02-6762-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
56	pDAS000124	gt19-6752-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
57	pDAS000124	gt19-6752-23-1	Biến thể gen có ít bản sao
58	pDAS000124	hh08-6761-1-1	h ki thể gen có ít bản sao
59	pDAS000124	hh08-6761-3-1	Biến thể gen có ít bản sao
60	pDAS000124	yl02-6762-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
61	pDAS000124	yl02-6762-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
62	pDAS000124	gt19-6752-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
63	pDAS000124	yl02-6762-12-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
64	pDAS000124	gt19-6752-6-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
65	pDAS000124	gt19-6752-22-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
66	pDAS000124	gt19-6752-24-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
67	pDAS000124	gt19-6752-18-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
68	pDAS000124	yl02-6762-5-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
69	pDAS000125	hh08-6780-9-1	Biến thể gen có ít bản sao
70	pDAS000125	yl02-6781-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
71	pDAS000125	hh08-6780-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
72	pDAS000125	hh08-6785-3-1	Biến thể gen có ít bản sao
73	pDAS000125	hh08-6780-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
74	pDAS000125	hh08-6780-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
75	pDAS000125	gt19-6777-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
76	pDAS000125	hh08-6785-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
77	pDAS000125	yl02-6781-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
78	pDAS000125	hh08-6780-16-1	Biến thể gen có ít bản sao
79	pDAS000125	hh08-6780-8-1	Biến thể gen có ít bản sao

Mục	Vector	Mã biến thể gen	Số T-ADN ước lượng được hợp nhất mã hóa DGT-28*
80	pDAS000125	hh08-6780-10-1	Biến thể gen có ít bản sao
81	pDAS000125	hh08-6780-11-1	Biến thể gen có ít bản sao
82	pDAS000125	hh08-6780-12-1	Biến thể gen có ít bản sao
83	pDAS000125	hh08-6780-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
84	pDAS000125	gt19-6777-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
85	pDAS000125	hh08-6785-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
86	pDAS000125	hh08-6780-13-1	Biến thể gen có ít bản sao
87	pDAS000125	hh08-6785-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
88	pDAS000125	hh08-6785-8-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
89	pDAS000125	yl02-6781-1-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
90	pDAS000125	hh08-6780-3-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
91	pDAS000125	yl02-6781-7-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
92	pDAS000125	hh08-6780-15-1	Biến thể gen có nhiều bản sao

*Dựa trên thử nghiệm qPCR duplex Taqman®. Ít và nhiều bản sao lần lượt biểu thị ≤ 3 và ≥ 4 T-ADN được hợp nhất.

Bảng 35. Thang tính điểm được sử dụng để ghi lại đáp ứng kiểu hình với glufosinat ở 4 ngày sau khi phun.

Điểm	Mô tả
0	Nảy mầm chậm hoặc hình thành cây kém; loại trừ khỏi phân tích tiếp theo
1	>75% lá chết hoại; cành non úa vàng/héo/chết
2	25-75% lá chết hoại; cành non/lá hầu hết úa vàng
3	10-25% lá chết hoại; <50% lá úa vàng; cành non héo trung bình; hơi úa vàng
4	<10% lá chết hoại; hơi héo; hơi úa vàng
5	Đầu lá chết hoại; thực vật còn lại khỏe mạnh
6	Thực vật khỏe mạnh

Mỗi thực vật trong thử nghiệm sau đó được tính điểm so với thang tính điểm, với người tính điểm “được làm mù” đối với kiểu gen thực vật để loại bỏ sự thiên vị trong tính điểm. Năm ngày sau khi tính điểm glufosinat, tất cả thực vật T1 và bản sao thứ nhất và thứ hai của cây lúa mì thể cho không được biến nạp được phun bằng glyphosat ở mức liều bằng 420 g ai/ha. Bản sao thứ ba còn lại của dòng lúa mì thể cho không được biến

nap (tổng cộng 12 cây) không được phun. Các thực vật được kiểm tra bằng mắt thường ở 7, 14 và 21 ngày sau khi phun. Thang tính điểm ghi lại các khoảng đáp ứng kiểu hình được nghiên cứu đối với mỗi thời điểm và được sử dụng để tính điểm toàn bộ thử nghiệm. Ở mỗi thời điểm, người tính điểm “được làm mù” đối với kiểu gen thực vật. Thang tính điểm ở 7 ngày sau khi phun nằm trong khoảng từ 0 đến 7 (Bảng 36), và từ 1 đến 4 ở 14 và 21 ngày sau khi phun (Bảng 37). Chiều cao thực vật, số lượng chồi và sự bất thường hình thái học cũng được ghi lại đối với mỗi thực vật ở 14 ngày sau khi phun glyphosat. Các thực vật bị chậm nảy mầm hoặc hình thành kém được loại trừ khỏi phân tích tiếp theo.

Bảng 36. Thang tính điểm được sử dụng để ghi lại đáp ứng kiểu hình với glyphosat ở 7 ngày sau khi phun.

Điểm	Mô tả
0	Thực vật bị chết
1	>75% lá chết hoại; cành non úa vàng/héo/chết
2	50-75% lá chết hoại; úa vàng nặng và héo
3	25-50% lá chết hoại; <50% lá úa vàng; héo trung bình
4	10-25% lá chết hoại; <25% lá úa vàng; hơi héo
5	<10% lá chết hoại; hơi úa vàng
6	Đầu lá chết hoại; thực vật còn lại khỏe mạnh
7	Thực vật khỏe mạnh

Bảng 37. Thang tính điểm được sử dụng để ghi lại đáp ứng kiểu hình với glyphosat ở 14 và 21 ngày sau khi phun.

Điểm	Mô tả
1	Thực vật bị chết
2	50-75% lá chết hoại; úa vàng nặng và héo; cây khô
3	<25% lá chết hoại; <25% lá úa vàng; hơi héo; các dấu hiệu của sự sinh trưởng
4	Thực vật khỏe mạnh

Phân tích đáp ứng với glufosinat không phát hiện thấy sự khác biệt rõ ràng về kiểu hình giữa cây lúa mì thể cho không được biến nạp được phun và các cây thể cho không được biến nạp không được phun (số liệu không được chỉ ra). Do đó, tính chống chịu của các biến thể gen chuyển gen đối với glufosinat không thể được đánh giá một cách tin cậy.

Ngược lại, phân tích đáp ứng với glyphosat ở 21 ngày sau khi phun phát hiện thấy sự khác biệt rõ về kiểu hình giữa các thực vật thể cho không được biến nạp được phun và không được phun. Bảng 38. Vì vậy, phân tích về tính chống chịu glyphosat trong số các biến thể gen chuyển gen dựa trên điểm đáp ứng được tính ở 21 ngày sau khi phun. Biến thể gen chuyển gen được coi là có tính chống chịu glyphosat khi 4 hoặc nhiều hơn trong số 12 thực vật T1 mà biến thể gen của nó có điểm đáp ứng lớn hơn hoặc bằng 3. Tiêu chuẩn này dựa trên mong đợi rằng mỗi biến thể gen sẽ tách với tỉ lệ 1:2:1 (đồng hợp tử có mặt: bán hợp tử: đồng hợp tử không có mặt) đối với gen chuyển ở thể hệ T1 và cho phép các biến thể gen có biểu hiện DGT28 yếu được nhận dạng. Các biến thể gen chuyển gen được xếp thứ hạng đối với tính chống chịu glyphosat quan sát được bằng cách sử dụng điểm tập hợp tùy ý được tính từ các thực vật chịu được riêng. Điểm tập hợp được tính từ điểm đáp ứng ở 14 và 21 ngày và chiều cao thực vật, số lượng chồi và sự bất thường hình thái học được ghi lại ở 14 ngày sau khi phun.

Bảng 38. Đáp ứng kiểu hình của cây lúa mì thể cho không được biến nạp đối với việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ ở 21 ngày sau khi phun.

	Glufosinat được phun	Glyphosat được phun	Mức sống sót
Bản sao 1	Có	Có	10 trong số 12 chết/khô
Bản sao 2	Không	Có	10 trong số 12 chết/khô
Bản sao 3	Không	Không	12 trong số 12 khỏe mạnh

Nói chung, 67 trong số 92 biến thể gen chuyển gen được sàng lọc thể hiện bằng chứng đối với tính chống chịu glyphosat. Bảng 39. Sáu biến thể gen chuyển gen được ước lượng là có ≤ 3 bản sao hợp nhất của gen chuyển và hai biến thể gen chuyển gen được ước lượng là có 4 hoặc nhiều hơn gen chuyển được hợp nhất được chọn đối với mỗi vectơ biểu hiện DGT-28 để bao gồm trong sàng lọc kiểu hình (chi tiết) thứ hai.

Bảng 39. Đáp ứng kiểu hình được xếp thứ hạng của các biến thể gen chuyển gen đối với việc xử lý bằng glyphosat.

Cấu trúc	Mã biến thể gen	Số bản sao T-ADN ước tính	% thực vật chịu được glyphosat	Kiểu hình biến thể gen	Điểm tập hợp được chuẩn hóa*	Được chọn để sàng lọc chi tiết
pDAS000122	mp45-6711-7-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	8,0	Có

Cấu trúc	Mã biến thể gen	Số bản sao T-ADN ước tính	% thực vật chịu được glyphosat	Kiểu hình biến thể gen	Điểm tập hợp được chuẩn hóa*	Được chọn để sàng lọc chi tiết
pDAS000124	gt19-6752-4-1	Ít bản sao	91,7%	Chịu được	7,3	Có
pDAS000122	gt19-6680-3-1	Nhiều bản sao	100,0%	Chịu được	7,2	Có
pDAS000123	gt19-6733-1-1	Nhiều bản sao	50,0%	Chịu được	7,2	Không
pDAS000122	mp45-6711-4-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	6,2	Có
pDAS000125	hh08-6780-8-1	Ít bản sao	58,3%	Chịu được	6,1	Có
pDAS000123	mp45-6739-16-1	Nhiều bản sao	75,0%	Chịu được	6,1	Có
pDAS000125	hh08-6780-10-1	Ít bản sao	75,0%	Chịu được	6,1	Có
pDAS000125	hh08-6785-8-1	Nhiều bản sao	50,0%	Chịu được	5,9	Có
pDAS000125	hh08-6785-7-1	Ít bản sao	50,0%	Chịu được	5,8	Có
pDAS000124	gt19-6752-22-1	Nhiều bản sao	91,7%	Chịu được	5,8	Có
pDAS000123	di01-6745-1-1	Nhiều bản sao	100,0%	Chịu được	5,7	Có
pDAS000122	hh08-6678-2-1	Ít bản sao	75,0%	Chịu được	5,5	Có
pDAS000122	hh08-6678-7-1	Ít bản sao	58,3%	Chịu được	5,3	Có
pDAS000125	hh08-6780-6-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	5,2	Có
pDAS000123	gt19-6733-6-1	Nhiều bản sao	83,3%	Chịu được	5,0	Không
pDAS000125	hh08-6780-11-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	5,0	Có
pDAS000125	hh08-6780-7-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	3,7	Có
pDAS000124	yl02-6762-8-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	3,5	Có
pDAS000124	yl02-6762-6-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	3,3	Có
pDAS000122	mp45-6711-2-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	3,2	Có
pDAS000122	mp45-6711-11-1	Nhiều bản sao	100,0%	Chịu được	3,0	Có
pDAS000122	mp45-6677-5-1	Ít bản sao	33,3%	Chịu được	2,7	Không
pDAS000125	hh08-6785-4-1	Ít bản sao	58,3%	Chịu được	2,5	Không
pDAS000123	yl02-6735-1-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	2,1	Có
pDAS000122	mp45-6711-3-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	1,7	Không
pDAS000125	yl02-6781-1-1	Nhiều bản sao	41,7%	Chịu được	1,7	Không
pDAS000124	hh08-6761-1-1	Ít bản sao	100,0%	Chịu được	1,6	Có
pDAS000125	hh08-6780-16-1	Ít bản sao	91,7%	Chịu được	1,4	Không
pDAS000123	hh08-6729-8-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	1,1	Có
pDAS000125	hh08-6780-1-1	Ít bản sao	91,7%	Chịu được	0,9	Không
pDAS000123	hh08-6729-5-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	0,7	Có
pDAS000124	mp45-6756-1-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	0,7	Có

Cấu trúc	Mã biến thể gen	Số bản sao T-ADN ước tính	% thực vật chịu được glyphosat	Kiểu hình biến thể gen	Điểm tập hợp được chuẩn hóa*	Được chọn để sàng lọc chi tiết
pDAS000123	mp45-6739-14-1	Ít bản sao	91,7%	Chịu được	0,5	Có
pDAS000125	gt19-6777-2-1	Ít bản sao	75,0%	Chịu được	0,3	Không
pDAS000124	yl02-6762-5-1	Nhiều bản sao	91,7%	Chịu được	0,2	Không
pDAS000125	hh08-6780-3-1	Nhiều bản sao	66,7%	Chịu được	0,0	Có
pDAS000122	mp45-6696-1-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	-0,1	Không
pDAS000122	hh08-6678-8-1	Ít bản sao	58,3%	Chịu được	-0,1	Có
pDAS000125	hh08-6780-12-1	Ít bản sao	75,0%	Chịu được	-0,3	Không
pDAS000125	yl02-6781-4-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-0,4	Không
pDAS000124	gt19-6752-6-1	Nhiều bản sao	50,0%	Chịu được	-0,9	Không
pDAS000122	mp45-6696-4-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-0,9	Không
pDAS000125	hh08-6780-9-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-1,1	Không
pDAS000123	mp45-6739-5-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	-1,1	Có
pDAS000124	yl02-6762-1-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-1,1	Không
pDAS000123	yl02-6735-5-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	-1,3	Không
pDAS000124	yl02-6762-7-1	Ít bản sao	91,7%	Chịu được	-1,6	Có
pDAS000124	gt19-6752-24-1	Nhiều bản sao	50,0%	Chịu được	-1,6	Không
pDAS000123	mp45-6739-7-1	Ít bản sao	41,7%	Chịu được	-1,7	Không
pDAS000124	gt19-6752-18-1	Nhiều bản sao	100,0%	Chịu được	-1,7	Có
pDAS000123	gt19-6733-2-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-1,8	Không
pDAS000124	gt19-6752-10-1	Ít bản sao	33,3%	Chịu được	-2,0	Không
pDAS000123	mp45-6739-4-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-2,0	Có
pDAS000125	gt19-6777-5-1	Ít bản sao	50,0%	Chịu được	-2,4	Không
pDAS000124	gt19-6752-14-1	Ít bản sao	58,3%	Chịu được	-2,5	Không
pDAS000122	yl02-6709-1-1	Nhiều bản sao	50,0%	Chịu được	-2,5	Không
pDAS000125	yl02-6781-8-1	Ít bản sao	58,3%	Chịu được	-2,7	Không
pDAS000124	gt19-6752-23-1	Ít bản sao	83,3%	Chịu được	-2,7	Không
pDAS000124	mp45-6756-2-1	Ít bản sao	75,0%	Chịu được	-2,7	Không
pDAS000124	yl02-6762-3-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-3,4	Không
pDAS000123	gt19-6733-8-1	Ít bản sao	41,7%	Chịu được	-3,4	Không
pDAS000123	hh08-6729-7-1	Ít bản sao	50,0%	Chịu được	-3,6	Không
pDAS000125	hh08-6785-3-1	Ít bản sao	66,7%	Chịu được	-4,2	Không
pDAS000123	mp45-6739-1-1	Nhiều bản sao	33,3%	Chịu được	-4,4	Không
pDAS000122	mp45-6711-31-1	Nhiều bản sao	41,7%	Chịu được	-4,5	Không

Cấu trúc	Mã biến thể gen	Số bản sao T-ADN ước tính	% thực vật chịu được glyphosat	Kiểu hình biến thể gen	Điểm tập hợp được chuẩn hóa*	Được chọn để sàng lọc chi tiết
pDAS000125	hh08-6780-15-1	Nhiều bản sao	66,7%	Chịu được	-4,8	Không
pDAS000123	gt19-6733-10-1	Ít bản sao	33,3%	Chịu được	-5,1	Không
pDAS000125	hh08-6780-13-1	Ít bản sao	100,0%	Chịu được	-5,5	Không
pDAS000122	mp45-6711-5-1	Ít bản sao	75,0%	Chịu được	-5,7	Không
pDAS000122	mp45-6711-10-1	Nhiều bản sao	58,3%	Chịu được	-10,4	Không
pDAS000123	gt19-6733-5-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000124	gt19-6752-7-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000122	hh08-6718-2-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000123	hh08-6729-9-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000124	hh08-6761-3-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000125	hh08-6785-1-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000122	mp45-6696-2-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000123	mp45-6739-2-1	Ít bản sao	0,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000122	km51-6686-1-1	Ít bản sao	8,3%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000122	mp45-6711-6-1	Ít bản sao	8,3%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000124	yl02-6762-12-1	Nhiều bản sao	8,3%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000123	gt19-6733-7-1	Ít bản sao	16,7%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000123	hh08-6729-3-1	Nhiều bản sao	16,7%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000124	mp45-6756-4-1	Ít bản sao	16,7%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000125	hh08-6780-4-1	Ít bản sao	16,7%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000122	hh08-6678-6-1	Ít bản sao	25,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000123	gt19-6733-9-1	Ít bản sao	25,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000123	hh08-6729-6-1	Ít bản sao	25,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000124	yl02-6762-11-1	Ít bản sao	25,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000124	yl02-6762-4-1	Ít bản sao	25,0%	Mẫn cảm	n/a	Không
pDAS000125	yl02-6781-7-1	Nhiều bản sao	25,0%	Mẫn cảm	n/a	Không

*Điểm dương cho thấy tính chống chịu glyphosat cao hơn. Điểm tập hợp được chuẩn hóa đối với cây lúa mì thể cho không được biến nạp không được xử lý là 12,2.

Sàng lọc kiểu hình chi tiết

Bốn bản sao của 12 hạt T1 trên mỗi biến thể gen được chọn và tám bản sao (12 hạt mỗi bản sao) của cây lúa mì thể cho không được biến nạp dòng Bobwhite MPB26RH được gieo trong các chậu kích thước 85 mm và được phát triển đến giai đoạn 2 lá trong điều kiện tưới đủ nước ở nhiệt độ 25°C với ánh sáng bổ sung tạo ra chu kỳ sáng 12 giờ.

Các chậu được đặt trong thiết kế ngẫu nhiên để cho phép các ảnh hưởng của môi trường được loại bỏ trong khi phân tích dữ liệu. Các biến thể gen chuyển gen được sàng lọc được liệt kê trong Bảng 40. Ở giai đoạn 2 lá, chiều cao thực vật và số lượng lá được ghi lại đối với mỗi thực vật trước khi phun bằng glyphosat. Bản sao thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư của các thực vật T1 đối với mỗi biến thể gen được chọn và dòng cây lúa mì thể cho không được biến nạp được phun ở mức liều lần lượt là 420, 840, 1680 và 3360 g ai/ha. Băm sạp thứ năm, thứ sáu, thứ bảy và thứ tám của dòng cây lúa mì thể cho không được biến nạp (tổng cộng 48 thực vật) không được phun. Ở 7, 14 và 21 ngày sau khi phun, các thực vật được tính điểm về chiều cao thực vật, số lượng lá và đáp ứng kiểu hình với glyphosat bằng cách sử dụng thang tính điểm trong Bảng 37. Sự bất thường hình thái học bất kỳ cũng được ghi lại. Để tính điểm, người tính điểm “được làm mù” về kiểu gen thực vật và mức liều phun để tránh thiên vị trong tính điểm. Các thực vật bị chậm nảy mầm và hình thành kém (các tiêu chuẩn: chiều cao thực vật <6 cm) khi tính điểm trước khi phun bị loại trừ khỏi phân tích tiếp theo.

Bảng 40. Các biến thể gen chuyển gen được thử nghiệm trong sàng lọc kiểu hình chi tiết.

Mục	Vector	Mã biến thể gen	Số T-ADN ước lượng được hợp nhất mã hóa DGT-28*
1	pDAS000122	mp45-6677-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
2	pDAS000122	mp45-6711-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
3	pDAS000122	mp45-6711-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
4	pDAS000122	hh08-6678-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
5	pDAS000122	hh08-6678-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
6	pDAS000122	hh08-6678-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
7	pDAS000122	mp45-6711-2-1	Biến thể gen có ít bản sao
8	pDAS000122	gt19-6680-3-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
9	pDAS000122	mp45-6711-11-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
10	pDAS000123	yl02-6735-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
11	pDAS000123	hh08-6729-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
12	pDAS000123	hh08-6729-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
13	pDAS000123	mp45-6739-14-1	Biến thể gen có ít bản sao
14	pDAS000123	mp45-6739-5-1	Biến thể gen có ít bản sao
15	pDAS000123	mp45-6739-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
16	pDAS000123	mp45-6739-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
17	pDAS000123	mp45-6739-16-1	Biến thể gen có nhiều bản sao

Mục	Vector	Mã biến thể gen	Số T-ADN ước lượng được hợp nhất mã hóa DGT-28*
18	pDAS000123	di01-6745-1-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
19	pDAS000124	gt19-6752-4-1	Biến thể gen có ít bản sao
20	pDAS000124	yl02-6762-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
21	pDAS000124	yl02-6762-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
22	pDAS000124	hh08-6761-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
23	pDAS000124	mp45-6756-1-1	Biến thể gen có ít bản sao
24	pDAS000124	yl02-6762-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
25	pDAS000124	gt19-6752-22-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
26	pDAS000124	gt19-6752-18-1	Biến thể gen có nhiều bản sao
27	pDAS000125	hh08-6780-8-1	Biến thể gen có ít bản sao
28	pDAS000125	hh08-6780-10-1	Biến thể gen có ít bản sao
29	pDAS000125	hh08-6785-7-1	Biến thể gen có ít bản sao
30	pDAS000125	hh08-6780-6-1	Biến thể gen có ít bản sao
31	pDAS000125	hh08-6780-11-1	Biến thể gen có ít bản sao
32	pDAS000125	hh08-6780-7-1	Biến thể gen có ít bản sao

*Dựa trên thử nghiệm qPCR duplex Taqman®. Ít và nhiều bản sao lần lượt biểu thị ≤ 3 và ≥ 4 T-ADN được hợp nhất.

Phân tích đáp ứng với glyphosat ở 7, 14 và 21 ngày sau khi phun phát hiện thấy sự khác biệt rõ về kiểu hình giữa các cây lúa mì thể cho không được biến nạp được phun và không được phun. Sự khác biệt này là lớn nhất ở 21 ngày và được quan sát qua tất cả các mức liều glyphosat. Bảng 41. Để đánh giá tính chống chịu của các biến thể gen chuyển gen với glyphosat ở mỗi mức liều phun, các thực vật T1 vô hiệu (tức là các thực vật không mang gen chuyển) bị loại trừ khỏi phân tích tiếp theo. Các thực vật T1 có điểm đáp ứng nhỏ hơn ba ở 21 ngày sau khi phun được coi là có kiểu gen vô hiệu. Phân tích phương sai (ANOVA) dựa trên kiểu hình chịu được thuốc phát hiện thấy tác dụng đáng kể đối với cấu trúc biểu hiện DGT-28, biến thể gen chuyển gen và liều phun glyphosat. Bảng 42. Tuy nhiên, thử nghiệm đa so sánh đã không giải thích sinh học ý nghĩa về nguồn gốc của các khác biệt này do khoảng giới hạn của điểm đáp ứng (tức là 1 đến 4; Bảng 40) được sử dụng để ghi lại kiểu hình của các thực vật riêng. Nói chung, tám biến thể gen chuyển gen độc lập được thử nghiệm đối với mỗi cấu trúc biểu hiện DGT-28 cho thấy tính chống chịu với glyphosat tương tự ở mỗi mức liều phun, chứng tỏ rằng tất cả bốn gen chuyển DGT-28 đều truyền kiểu hình nổi trội và một bản sao là đủ để truyền

tính chống chịu glyphosat. Mỗi trong số các cấu trúc biểu hiện DGT-28 thể hiện tính chống chịu hiệu quả với ít nhất 3360 g ai/ha glyphosat.

Bảng 41. Đáp ứng kiểu hình của cây lúa mì thể cho không được biến nạp đối với việc xử lý bằng glyphosat khác nhau ở 21 ngày sau khi phun.

	Mức liều (g ai/ha)	Số thực vật ở lần tính điểm trước khi phun	Số thực vật sống sót ở 14 ngày sau khi phun	Số thực vật sống sót ở 21 ngày sau khi phun
Bản sao 1	420	10	0	0
Bản sao 2	840	10	3	0
Bản sao 3	1680	11	0	0
Bản sao 4	3360	10	1	0
Bản sao 5	0	9	8	8
Bản sao 6	0	8	8	8
Bản sao 7	0	12	12	12
Bản sao 8	0	12	12	12

Bảng 42. Phân tích phương sai (ANOVA) dựa trên các thực vật chịu được glyphosat.

	Df ¹	Tổng các bình phương	Bình phương trung bình	Giá trị F	Pr(>F) ²
Bản sao	11	1,29	0,12	0,728	0,71181
Vector	4	139,54	34,88	216,025	2,00E-16***
Biến thể gen_Mã	29	178,52	6,16	38,122	2,00E-16***
Liều phun	3	2,14	0,71	4,417	0,00427**

¹Bậc tự do; ²Ý nghĩa thống kê lần lượt ở 0,001 (***) và 0,01 (**).

Xác nhận phân tử của T-ADN có mặt trong các thực vật T1 chịu được glyphosat

Thử nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử PCR được nghiên cứu trong ví dụ 2 được sử dụng để xác nhận sự có mặt của T-ADN mã hóa DGT-28 trong các thực vật T1 chịu được glyphosat được lưu giữ để sản xuất hạt T2 (xem ví dụ 6). Nói chung, thử nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử PCR được thực hiện đối với 104 thực vật T1, trong đó 89% được xác nhận là chứa ít nhất một bản sao của gen chuyển. Bảng 43. Các kết quả này xác nhận rằng tính chống chịu glyphosat quan sát được được tạo ra nhờ sự có mặt của T-ADN mã hóa DGT-28.

Bảng 43. Sự phân biệt gen chuyển quan sát được trong số các thực vật T1.

Cấu trúc	Mã biến thể gen	Đồng hợp tử đối với sự có mặt của gen chuyển	Bán hợp tử đối với sự có mặt của gen chuyển	Đồng hợp tử đối với sự vắng mặt của gen chuyển	Các thực vật mọc tự nhiên quan sát được
pDAS000122	hh08-6678-2-1	0	7	2	Có
pDAS000122	hh08-6678-8-1	2	7	0	Không
pDAS000123	hh08-6729-5-1	7	4	0	Không
pDAS000123	mp45-6739-14-1	1	8	0	Không
pDAS000123	mp45-6739-5-1	0	9	0	Không
pDAS000124	gt19-6752-4-1	5 (đồng hoặc bán hợp tử)		3	Có
pDAS000124	hh08-6761-1-1	3	2	3	Có
pDAS000124	yl02-6762-6-1	7 (đồng hoặc bán hợp tử)		2	Có
pDAS000124	yl02-6762-8-1	3	6	0	Không
pDAS000125	hh08-6780-10-1	6	4	0	Không
pDAS000125	hh08-6780-8-1	2	7	1	Có

Tạo ra hạt T2 của các biến thể gen chuyển gen chịu được glyphosat

Khoảng tám thực vật T1 chịu được glyphosat được lưu giữ từ sàng lọc kiểu hình đối với 32 biến thể gen chuyển gen được chọn để bao gồm trong sàng lọc kiểu hình chi tiết (Bảng 40). Các thực vật được chuyển sang chậu kích thước 200 mm và được phát triển trong điều kiện tưới nước đầy đủ ở nhiệt độ 25 °C cùng với việc chiếu sáng bổ sung tạo ra chu kỳ sáng 12 giờ. Các bông trên mỗi thực vật được buộc túi riêng rẽ trước khi nở hoa để tránh lai ngoài dòng.

Trong khi sáng chế đã được mô tả theo một số phương án nhất định, các phương án này có thể được cải biến thêm trong ý tưởng và phạm vi của sáng chế này. Do đó, đơn sáng chế này được dự định bao gồm cả các cải biến, mục đích sử dụng, hoặc điều chỉnh bất kỳ của các phương án theo sáng chế dựa trên nguyên tắc chung. Ngoài ra, đơn sáng chế này được dự định bao gồm các cải biến từ sáng chế này như là việc thực hiện đã biết hoặc thông thường trong lĩnh vực này mà các phương án này thuộc về và nằm trong phạm vi yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại, trong đó polynucleotit này mã hóa polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:1, mà khi được bắt cặp với SEQ ID NO:1, chứa alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 84 của SEQ ID NO:1 và/hoặc threonin ở vị trí tương ứng với vị trí 172 của SEQ ID NO:1.
2. Polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại theo điểm 1, trong đó polynucleotit này là polynucleotit tổng hợp đã được thiết kế để biểu hiện ở thực vật.
3. Vector chứa polynucleotit theo điểm 1.
4. Vector theo điểm 3, trong đó vector này chứa polynucleotit khác mã hóa polypeptit khác loại.
5. Vector theo điểm 3, trong đó vector này là vector biến nạp ở thực vật.
6. Tế bào vật chủ chứa polynucleotit theo điểm 1, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào vi khuẩn hoặc tế bào thực vật.
7. Vector theo điểm 5, trong đó trình tự khởi động là trình tự khởi động AtUbi10.
8. Tế bào vật chủ theo điểm 6, trong đó tế bào vật chủ này là tế bào thực vật.
9. Nguyên liệu thực vật chuyển gen chứa tế bào thực vật theo điểm 8, trong đó nguyên liệu thực vật này là phần thực vật, cơ quan thực vật hoặc hạt thực vật.
10. Nguyên liệu thực vật chuyển gen theo điểm 9, trong đó nguyên liệu thực vật này có tính chịu được glyphosat, khi so với thực vật kiểu dại thuộc cùng loài mà không chứa polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại.
11. Polynucleotit theo điểm 1, trong đó polypeptit có hoạt tính 5-enolpyruvylshikimat 3-phosphat syntaza.
12. Môi trường nuôi cấy mô của các tế bào có thể tái sinh được lấy từ nguyên liệu thực vật chuyển gen theo điểm 9.
13. Thể nguyên sinh được tạo ra từ nguyên liệu thực vật chuyển gen theo điểm 9.

14. Môi trường nuôi cấy mô theo điểm 12, trong đó các tế bào có thể tái sinh được lấy từ loại mô được chọn từ nhóm bao gồm lá, phần hoa, phôi, lá mầm, trụ dưới lá mầm, tế bào mô phân sinh, rễ, đầu rễ, bao phấn, hoa, thân và vỏ.

15. Thực vật được tái sinh từ môi trường nuôi cấy mô theo điểm 12, trong đó thực vật này có tính kháng glyphosat.

16. Phương pháp tạo ra thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, hoặc tế bào thực vật có tính kháng glyphosat, trong đó phương pháp này bao gồm:

biến nạp thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, hoặc tế bào thực vật bằng polynucleotit theo điểm 1; và

biểu hiện polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, mà khi được bắt cặp với SEQ ID NO:1, chứa alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 84 của SEQ ID NO:1 và/hoặc threonin ở vị trí tương ứng với vị trí 172 của SEQ ID NO:1,

nhờ đó tạo ra thực vật, phần thực vật, cơ quan thực vật, hạt thực vật, hoặc tế bào thực vật có tính kháng glyphosat.

17. Nguyên liệu thực vật chuyển gen theo điểm 9, trong đó nguyên liệu thực vật chuyển gen này có tính kháng thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm glufosinat; axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D); và thuốc diệt cỏ mà ức chế axetolactat syntaza (ALS).

18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó polynucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3.

19. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trong vùng trồng trọt chứa các thực vật kháng thuốc diệt cỏ, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

gieo trồng thực vật hoặc hạt thực vật chứa polynucleotit theo điểm 1 trong vùng trồng trọt; và

đưa một lượng vừa đủ thuốc diệt cỏ vào vùng trồng trọt này để phòng trừ ít nhất 85% các loài cỏ dại trong vùng trồng trọt này.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thuốc diệt cỏ là glyphosat.

21. Phương pháp theo điểm 19, trong đó thực vật hoặc hạt thực vật chứa phân tử axit nucleic theo điểm 1 chứa polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit khác loại.

22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó polynucleotit thứ hai là dioxygenaza phụ thuộc α -ketoglutarat 1 (aad-1) hoặc dioxygenaza phụ thuộc α -ketoglutarat 12 (aad-12).

23. Phương pháp truyền tính kháng thuốc diệt cỏ cho thực vật, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

tái sinh thực vật chuyển gen từ nguyên liệu thực vật chuyển gen theo điểm 9; và

biểu hiện polynucleotit sao cho tạo ra polypeptit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, mà khi được bắt cặp với SEQ ID NO:1, chứa alanin ở vị trí tương ứng với vị trí 84 của SEQ ID NO:1 và/hoặc threonin ở vị trí tương ứng với vị trí 172 của SEQ ID NO:1,

nhờ đó truyền tính kháng thuốc diệt cỏ cho thực vật.

24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó thuốc diệt cỏ là glyphosat.

25. Phương pháp theo điểm 23, trong đó cấu trúc ADN chứa polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit khác loại có thể biểu hiện được ở thực vật.

26. Phương pháp theo điểm 25, trong đó polypeptit khác loại là dioxygenaza phụ thuộc α -ketoglutarat 1 (aad-1) hoặc dioxygenaza phụ thuộc α -ketoglutarat 12 (aad-12).

27. Thực vật, chứa polynucleotit theo điểm 1 được hợp nhất một cách ổn định vào hệ gen của nó.

28. Thực vật theo điểm 27, trong đó thực vật này là cây đậu tương.

29. Thực vật theo điểm 27, trong đó thực vật này là cây ngô.

30. Thực vật theo điểm 27, trong đó thực vật này được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mì, cây ngô, cây đậu tương, cây thuốc lá, cây cỏ brachiaria, cây lúa, cây kê, cây lúa mạch, cây cà chua, cây táo, cây lê, cây dâu tây, cây cam, cây cỏ linh lăng, cây bông, cây cà rốt, cây khoai tây, cây củ cải đường, củ từ, cây rau diếp, cây rau bina, cây thuốc lá cảnh, cây hoa hồng, cây hoa cúc, lớp cỏ, cây thông, cây linh sam, cây vân sam, các thực vật hấp thụ kim loại nặng, cây hướng dương, cây rum, cây cải hạt dầu và *Arabidopsis*.

31. Thực vật theo điểm 27, trong đó thực vật này là loài được chọn từ nhóm bao gồm các chi *Asparagus*, *Avena*, *Brachiaria*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Erigeron*, *Glycine*, *Gossypium*, *Hordeum*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Lolium*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Nicotiana*, *Orychophragmus*, *Oryza*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Solanum*, *Sorghum*, *Triticum*, *Vitis*, *Vigna* và *Zea*.

32. Tế bào vật chủ theo điểm 8, trong đó tế bào thực vật này không thể tái sinh để tạo ra thực vật.

33. Polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại theo điểm 1, trong đó polynucleotit này mã hóa polypeptit có trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, trong đó polypeptit này có hoạt tính 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza có tính chịu được glyphosat.

34. Polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại theo điểm 33, trong đó polynucleotit này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:3.

35. Vector chứa polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại theo điểm 34.

36. Tế bào thực vật chuyển gen chứa polynucleotit được liên kết có điều khiển với trình tự khởi động khác loại theo điểm 34.

37. Nguyên liệu thực vật chuyển gen chứa tế bào thực vật theo điểm 36, trong đó nguyên liệu thực vật này là phần thực vật, cơ quan thực vật hoặc hạt thực vật.

38. Thực vật chuyển gen chứa tế bào thực vật theo điểm 36.

39. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trong vùng trồng trọt chứa các thực vật hoặc hạt thực vật chứa polynucleotit theo điểm 34, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

gieo trồng thực vật hoặc hạt thực vật trong vùng trồng trọt; và

đưa một lượng vừa đủ glyphosat vào vùng trồng trọt này để phòng trừ ít nhất 85% các loài cỏ dại trong vùng trồng trọt này.

SEQ ID NO:67 DGT-33 (60) --DRWVEGRPD-GPAAAPDAD-----VYCRDGATTARFLPTLVAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDIRH
 SEQ ID NO:68 DGT-32 (57) --DRWVQGRPA-GPAAATEAD-----VYCRDGATTARFLPTLVAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDIRH
 SEQ ID NO:145 DGT-31 (60) --DRWHEGRPS-GPAAADAE-----VHCRDGATTARFLPTLVAAAAASGTYRFDASAQMRRRPLAPLTRALTALGVDIRH
 SEQ ID NO:69 DGT-28 (60) --DTWQVDGRPQ-GPAAAEAD-----VYCRDGATTARFLPTLVAAAG-HGTYRFDASPOQRRRPLPLSRALRDLGVDIRH
 SEQ ID NO:70 grg-23 (59) --DDWVEGLGQ--APNLDAD-----TWCEADGTVARFLPPFVAAG-QGKTFDGDGSEQLRRRPLRPVVDGIRHLGARVSS
 SEQ ID NO:71 CP4 Agro (75) --DTWIIDGVNGGLIAPEAP-----IDFGNAATGCRIITMGIVGVYDFDSTFIGDASITKRPMPGRVINPLREMGVQVKS
 SEQ ID NO:72 DGT-3 (74) VNNRAVVEGCGGIFPASLDSKSDIELYLGNAGTAMRPLTAAVTAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDIWVGLKQLGADMEC
 SEQ ID NO:73 DGT-1 (81) TTKOATVEGCGGLFPTSKEKDEINLFLGNAGTAMRPLTAAVWAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKQLGADMDC
 SEQ ID NO:74 DGT-7 (82) VAKRAVVGCGGRFPVEKDAQEEVKLFLGNAGTAMRPLTAAVWAAGNATYVLDGVPRMRERPIGDIWVGLQQLGADADC
 SEQ ID NO:75 aroA (69) --DRTRCEIIGNGGPLHADG--ALELFLGNAGTAMRPLAAALCLGSN--DIVLTGEPMPKRPIGHLVDAIRLGGAKITY

FIG. 1

DRWHIEGRPSGPAADAEVHCRDGAATTARFLPTLAAAAASGTYRFDASQMRRRRLAPLTLALRTLGLVDLRHD

SEQ ID NO:76	DGT-3	(1)	MAQSSRICHGQVQNPCVIIISNLSKSNQNKSPFSVSLKTHQPRASSWGLKSGTMLNGSVIRPVKVTASVSTSEKASEIVLQ	80
SEQ ID NO:77	DGT-1	(1)	-----MASVAAAEEKPSTSPETIVLE	
SEQ ID NO:78	DGT-7	(1)	-----MATSVAAAPAPSGAEIVLQ	
			160	
DGT-3	(81)		PIREISGLIKLPGSKSLNRILLIAALSEGTTVDNLLINSDDINNYMIDALKKLGINVERDSNNRAVVEGCGGIFPASLD	
DGT-1	(20)		PIKDFSGTITLPGSKSLNRILLIAALSEGTTVDNLLYSEDIHYMLGALRTLGLRVEDDKTKQALVEGCGGLFPTSKE	
DGT-7	(21)		PIREISGAQQLPGSKSLNRILLISALSEGTTVDNLLINSEDVHYMIEALEALGLSVEADKVAKRAVVVCGGGRFPVEKD	
		** *	240	
DGT-3	(161)		SKSDIELYLGNAQTAMRPLTAAVTAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVGLKQLGADVVECTLGTNCPPVVRVNAANGGLPG	
DGT-1	(100)		SKDEINLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGNASYVLDGVPRMRERPIGDLVAGLKLQAGADVDCFLGTNCPPVVRVNGKGGGLPG	
DGT-7	(101)		AOEEVKLFLGNAGTAMRPLTAAVTAAGNATYVLDGVPRMRERPIGDLVVGLQQLGADADCEFLGTNCPPVVRINGKGGGLPG	
			320	
DGT-3	(241)		GKVKLSGSISSQYLTAALIMAAPIALIGDVEIEIIDKLIISVPYVEMTLKLMERFGVSAEHSDSWDRFEVKGQKYKSPGNAY	
DGT-1	(180)		GKVKLSGVSQYLTAALIMAAPIALIGDVEIEIIVDKLIISVPYVEMTLKLMERFGVSVHSNWDREFLVHGQKYKSPGNAF	
DGT-7	(181)		GKVKLSGSISSQYLSSLLIMAAPIALEDVEIEIIDKLIISVPYVEMTLKLMERFGVTAEHSDSWDRFYIKGQKYKSPGNAY	
			400	
DGT-3	(321)		VEGDASSASYFLAGAAITGETVTVEGCGTTSLOQDVKFAEVLKMGCKVSWTENSVTVTGPSRDAFGMRHLRAVDVNNMK	
DGT-1	(260)		VEGDASSASYLLAGAAITGGTITVNGCGTSSLOQDVKFAEVLKMGAKVTWSENSVTVSGPPRDFSGRKVLRGIDVNNMK	
DGT-7	(261)		VEGDASSASYFLAGAAITGGTVTVEGCGTTSLOQDVKFAEVLMMGAKVTWTDTSVTVTGPPRQPEGRKHLKAVDVNNMK	
			480	
DGT-3	(401)		MPDVAMTLAVVALFADGPTTIRDVASWRVKETERMIAICTELRKLGAATVEEGSDYCVITPEPAKVKPAEIDTYDDHRMAMA	
DGT-1	(340)		MPDVAMTLAVVALFANGPTAIRDVASWRVKETERMIAICTELRKLGAATVEEGPDYCVITPEKLNVTATIDTYDDHRMAMA	
DGT-7	(341)		MPDVAMTLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKETERMVAIRTELTKLGAATVEEGPDYCVITPEKLNITATIDTYDDHRMAMA	
			516	
DGT-3	(481)		FSLAACADVPVTIKDPGCTRKTPFPDYFQVIESITKH	
DGT-1	(420)		FSLAACGDVPVTIKDPGCTRKTPFPDYFEVLERLTKH	
DGT-7	(421)		FSLAACAEVPVTIRDPGCTRKTPFPDYFDVLSTFVKN	

FIG. 2

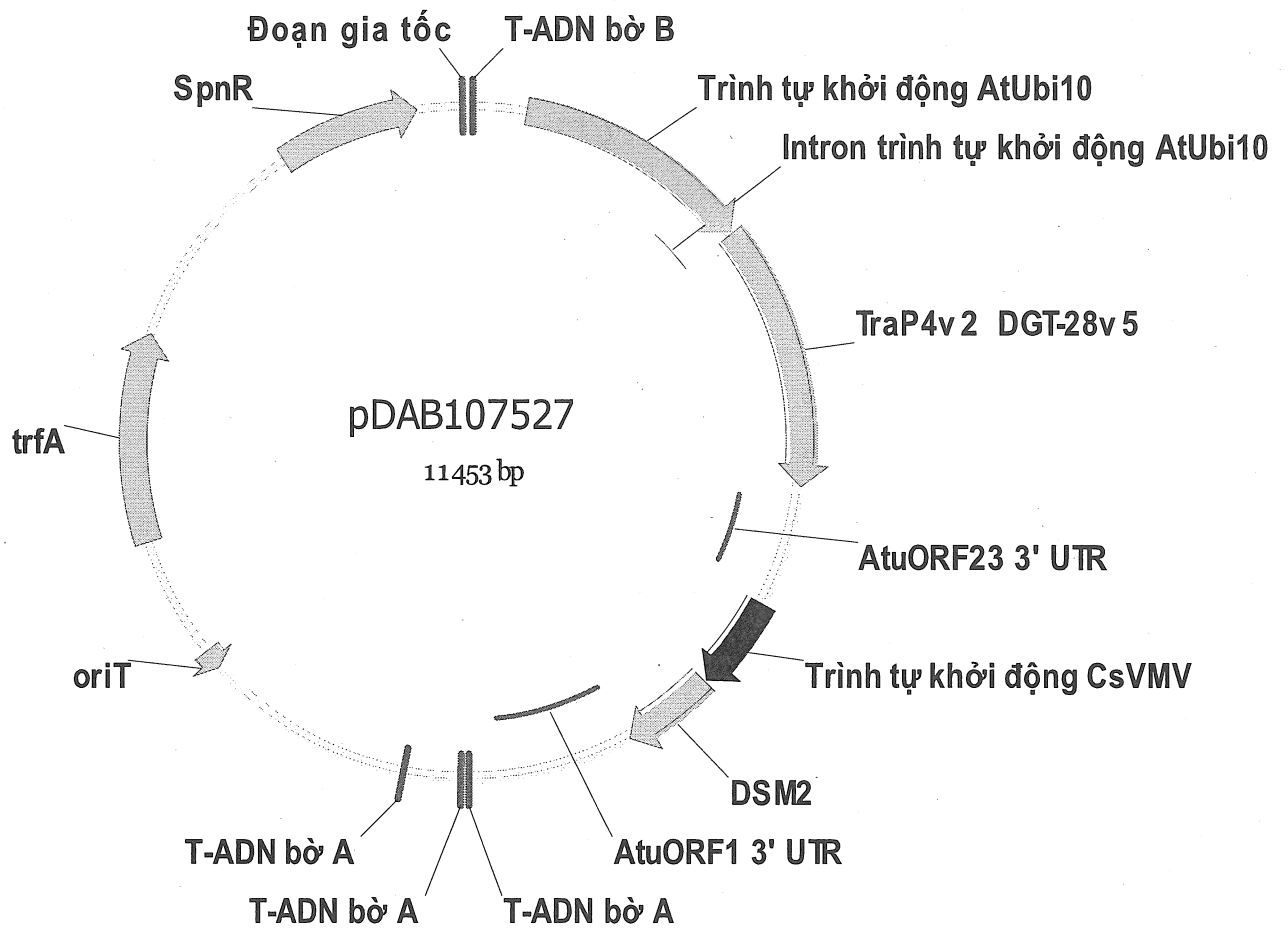


FIG.3

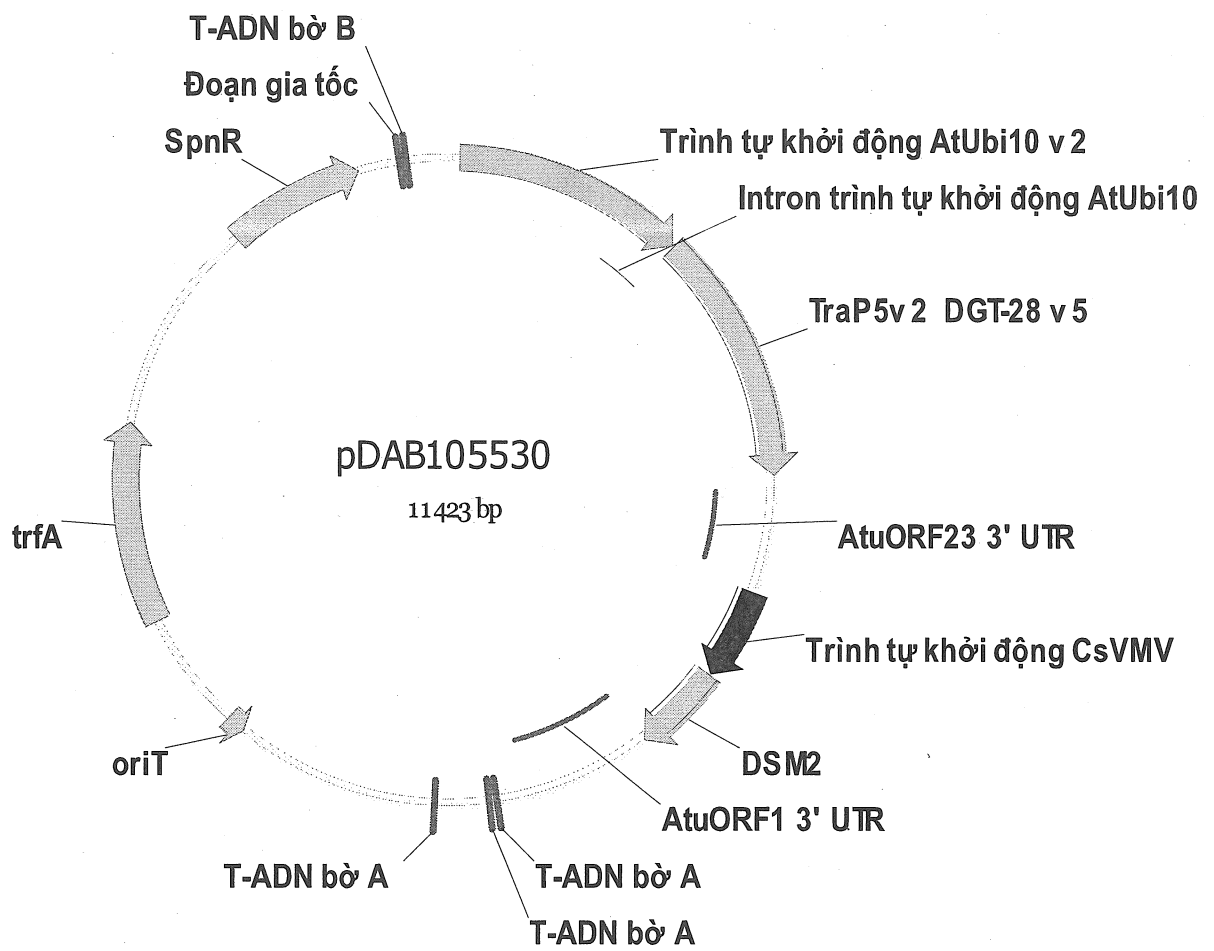


FIG.4

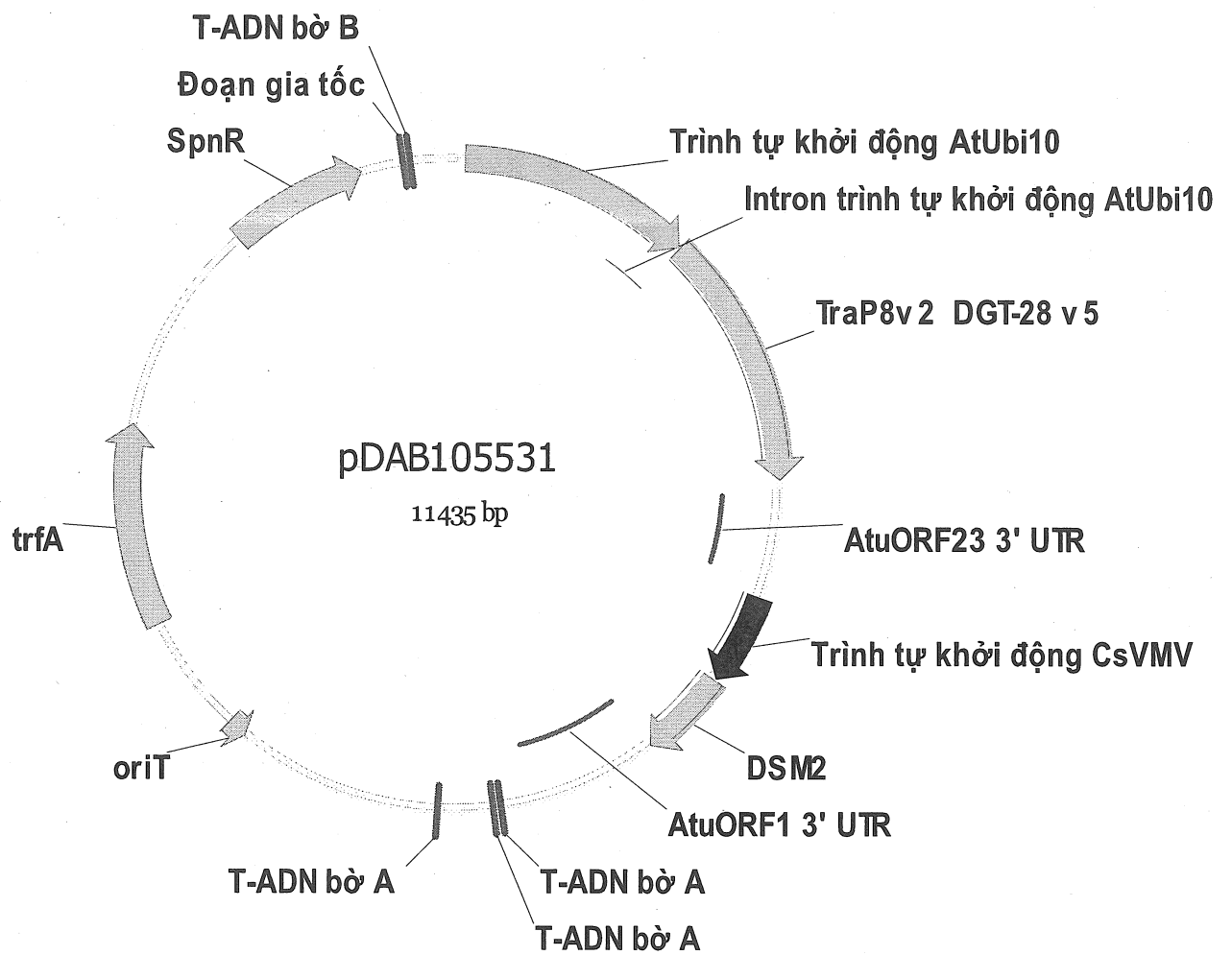


FIG.5

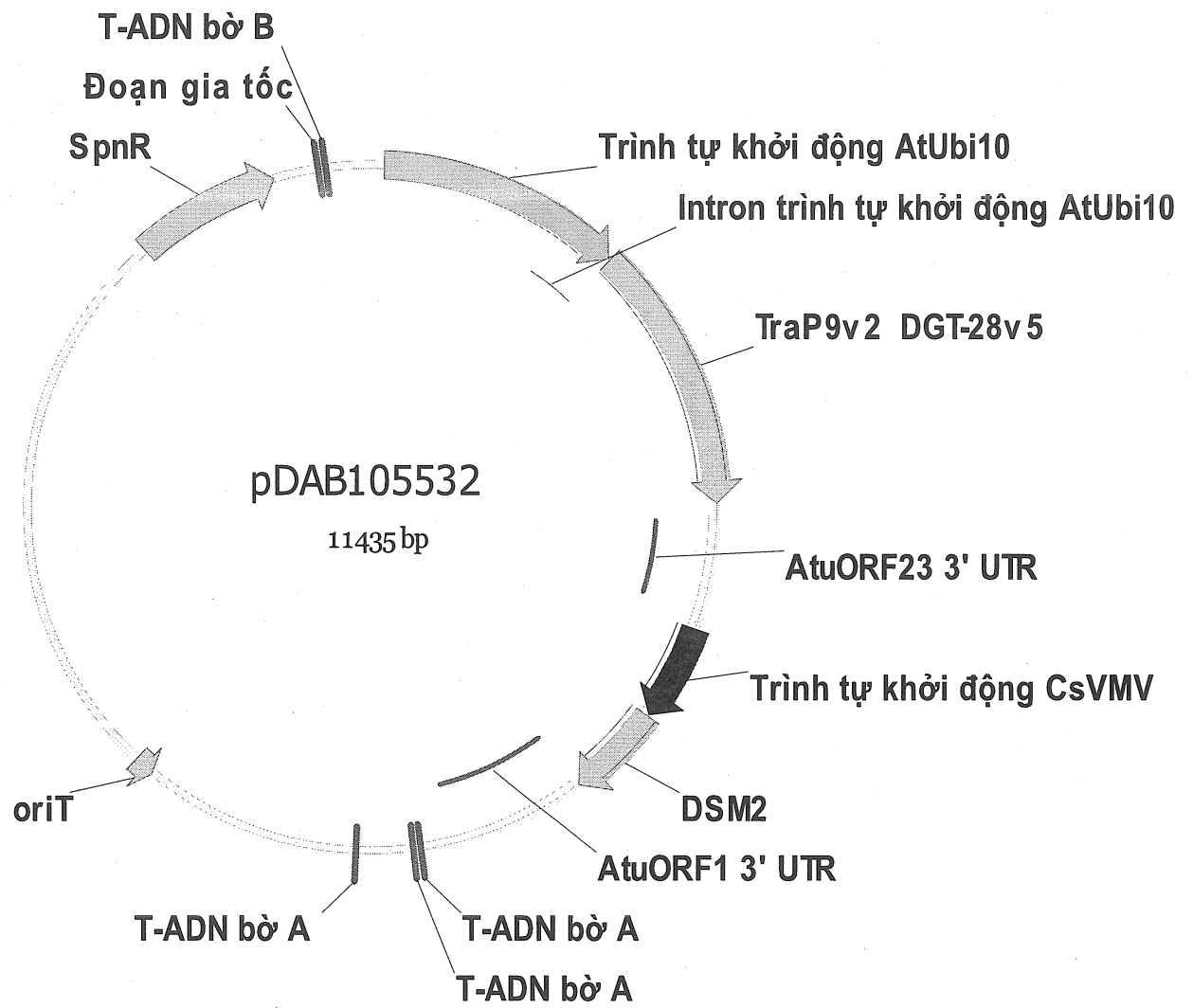


FIG.6

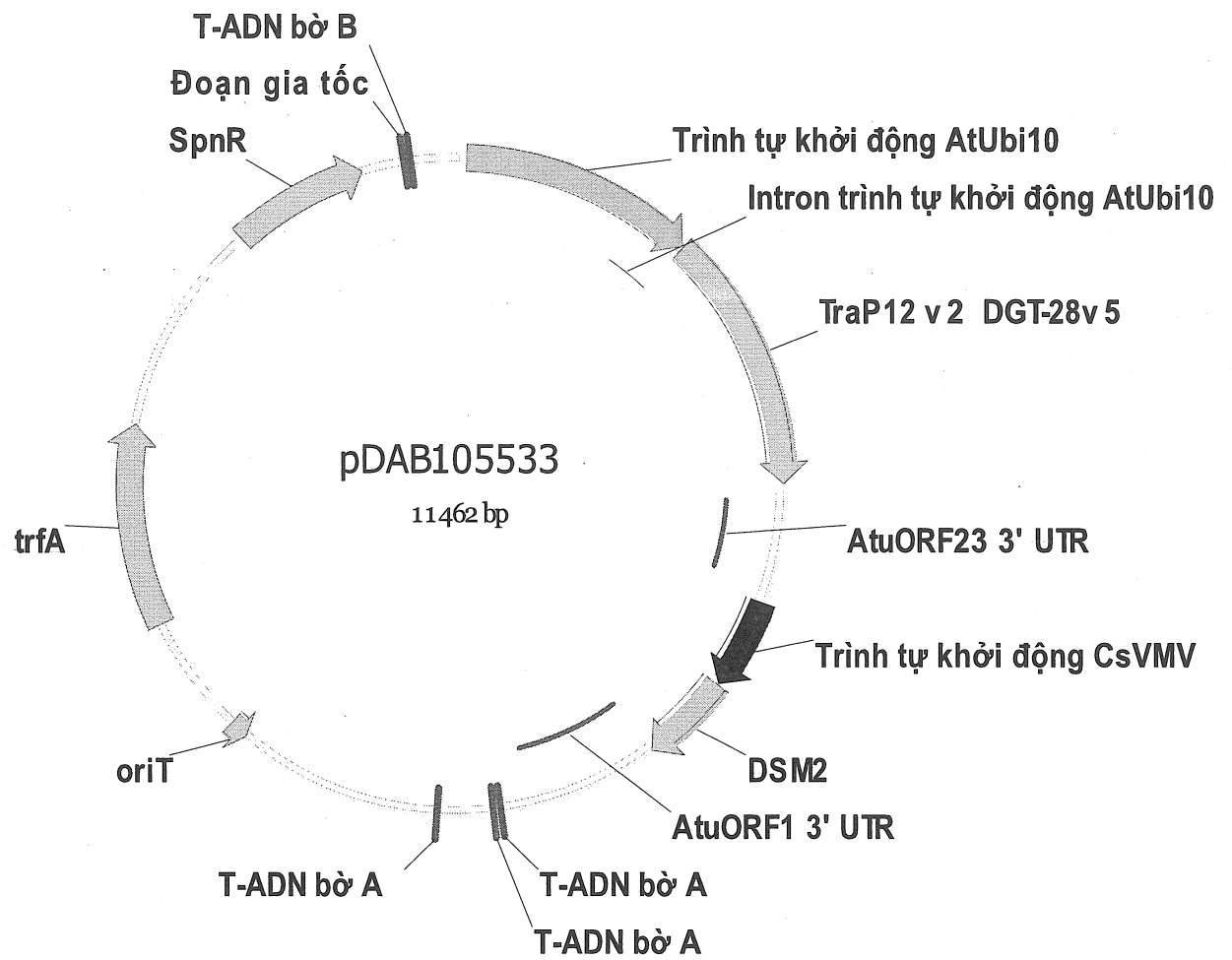


FIG.7

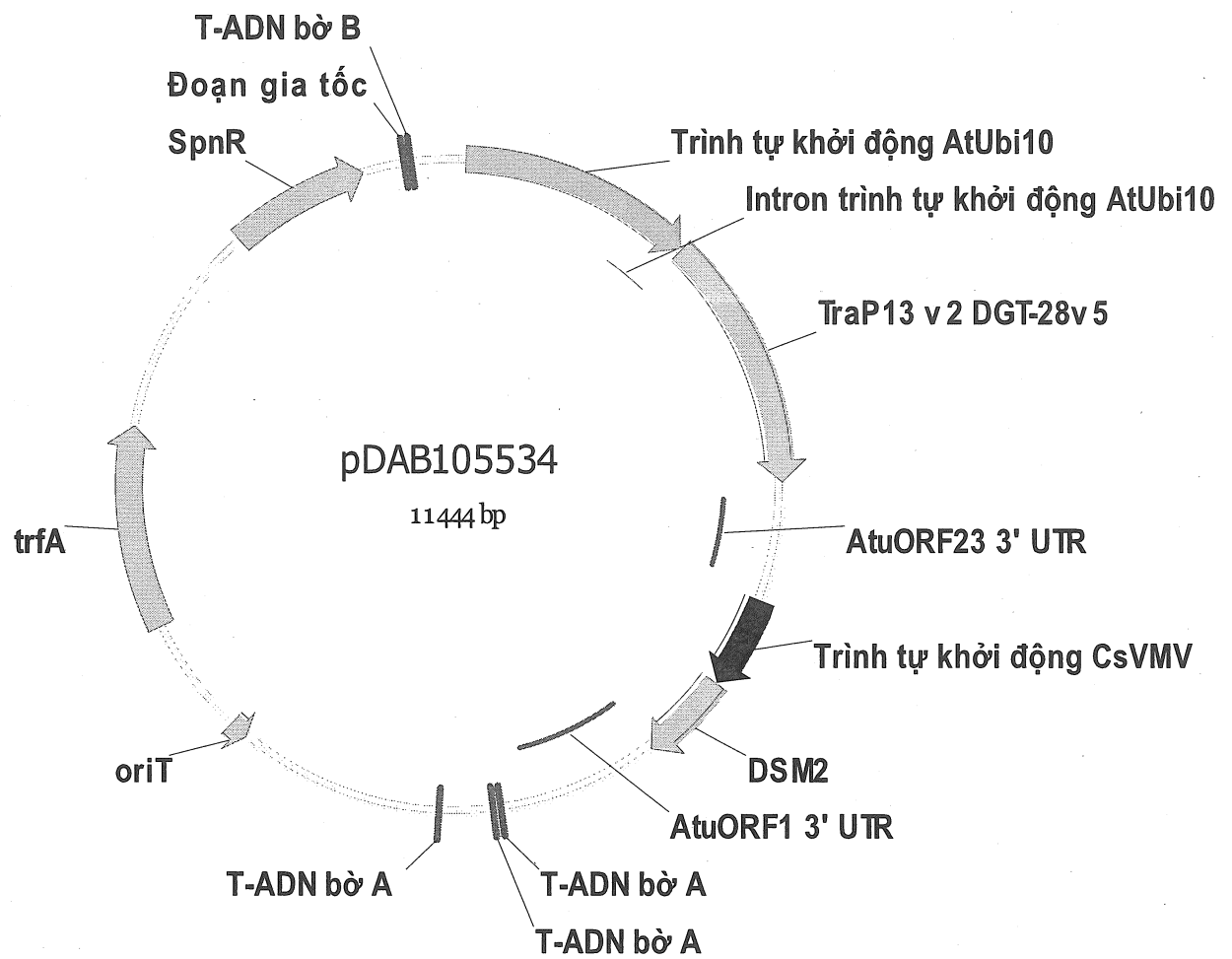


FIG.8

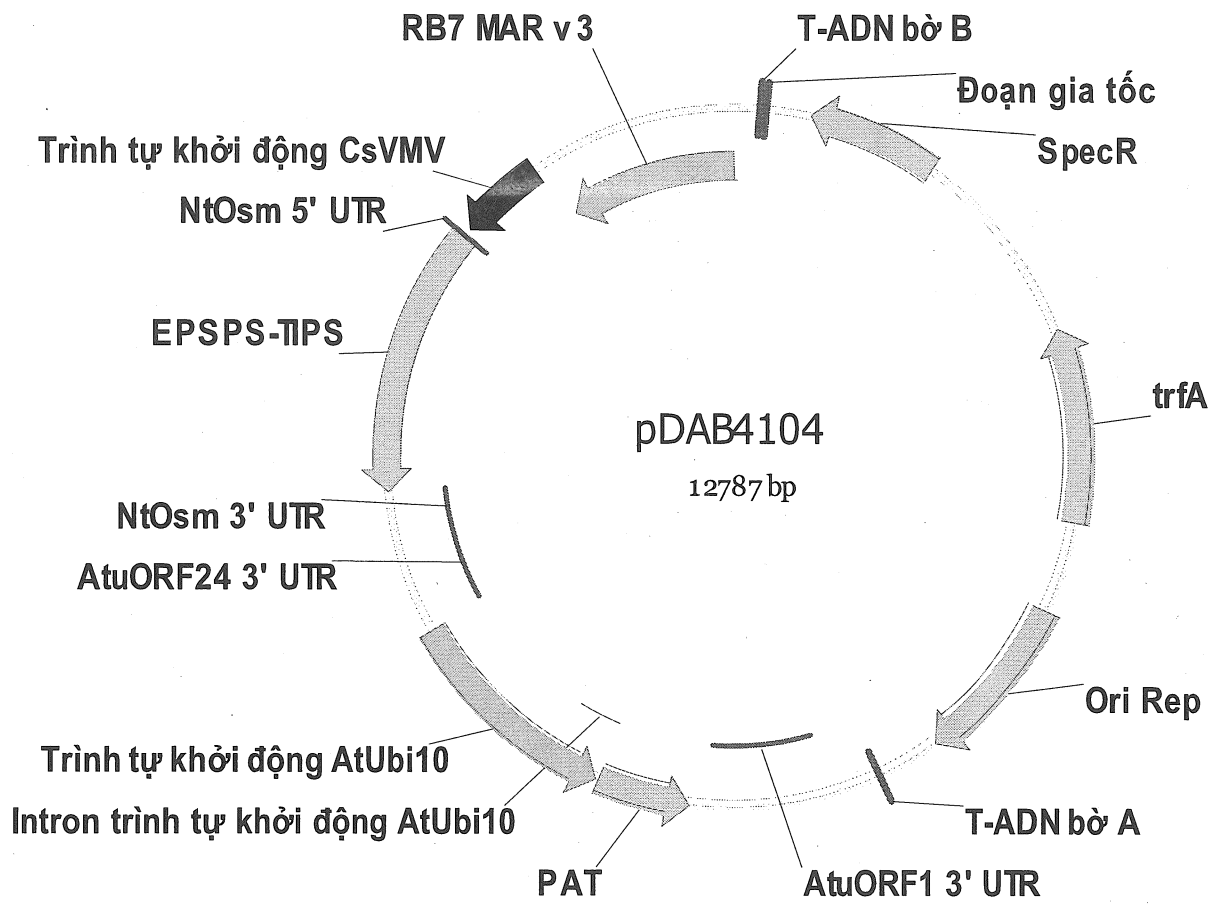


FIG.9

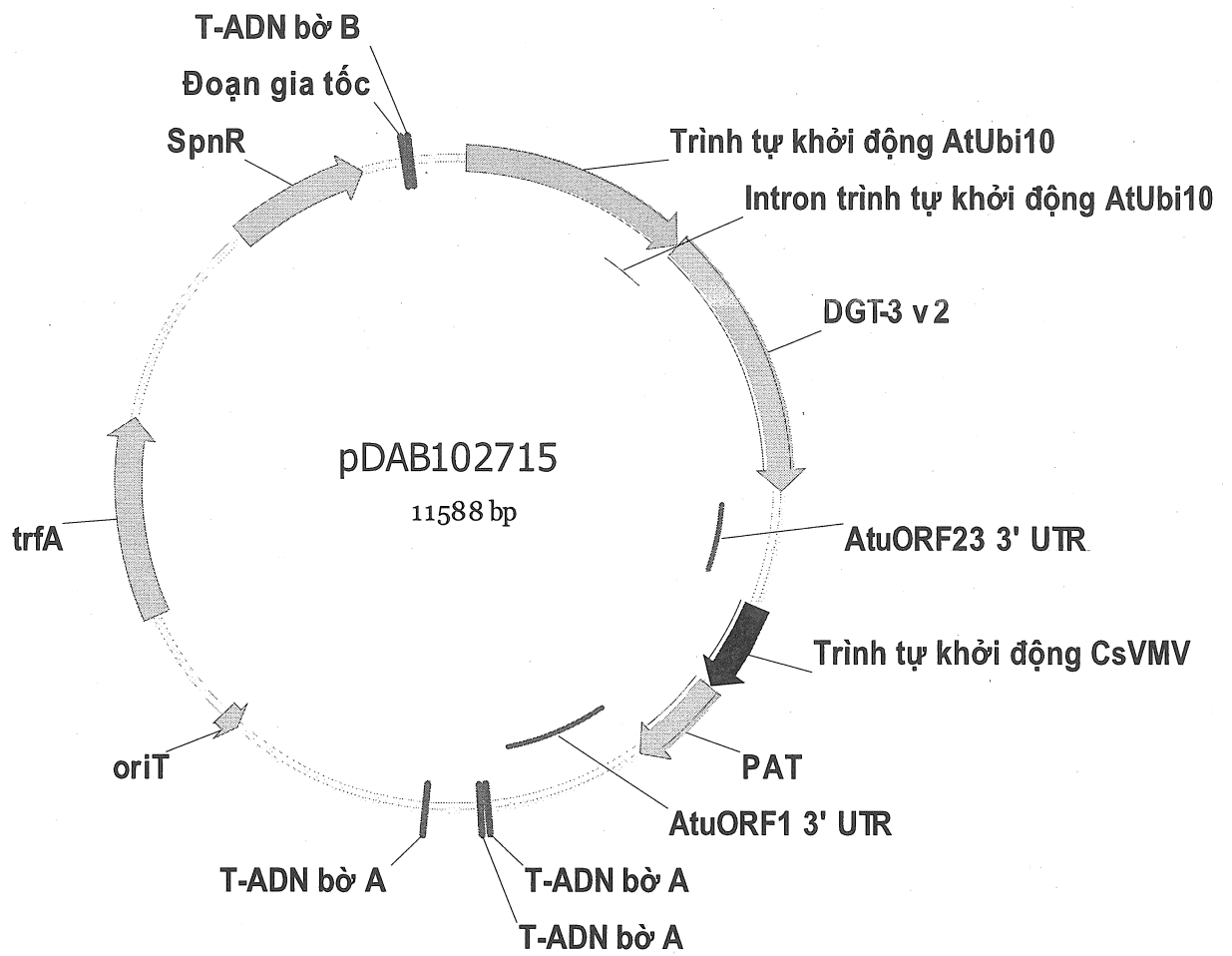


FIG. 10

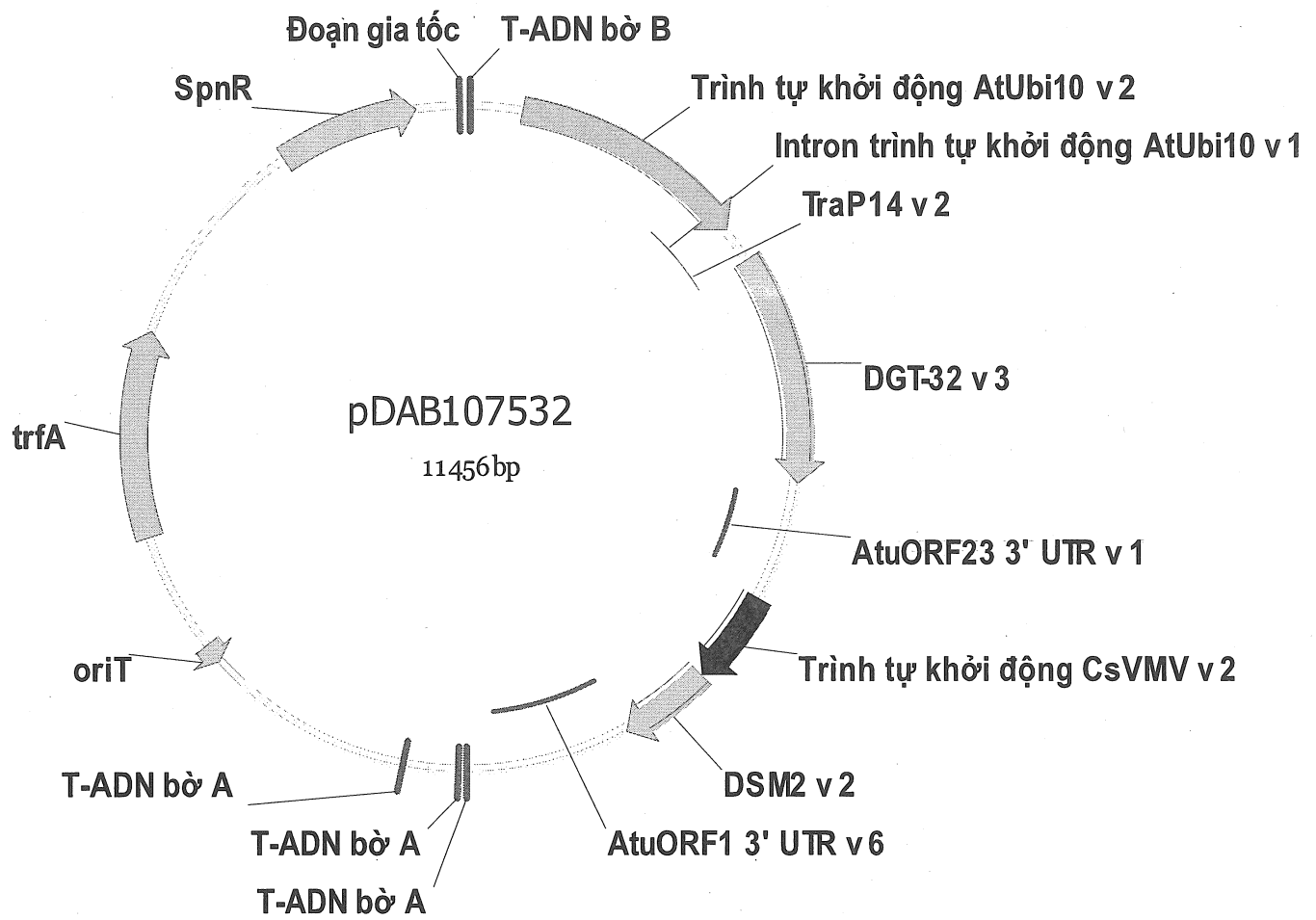


FIG. 11

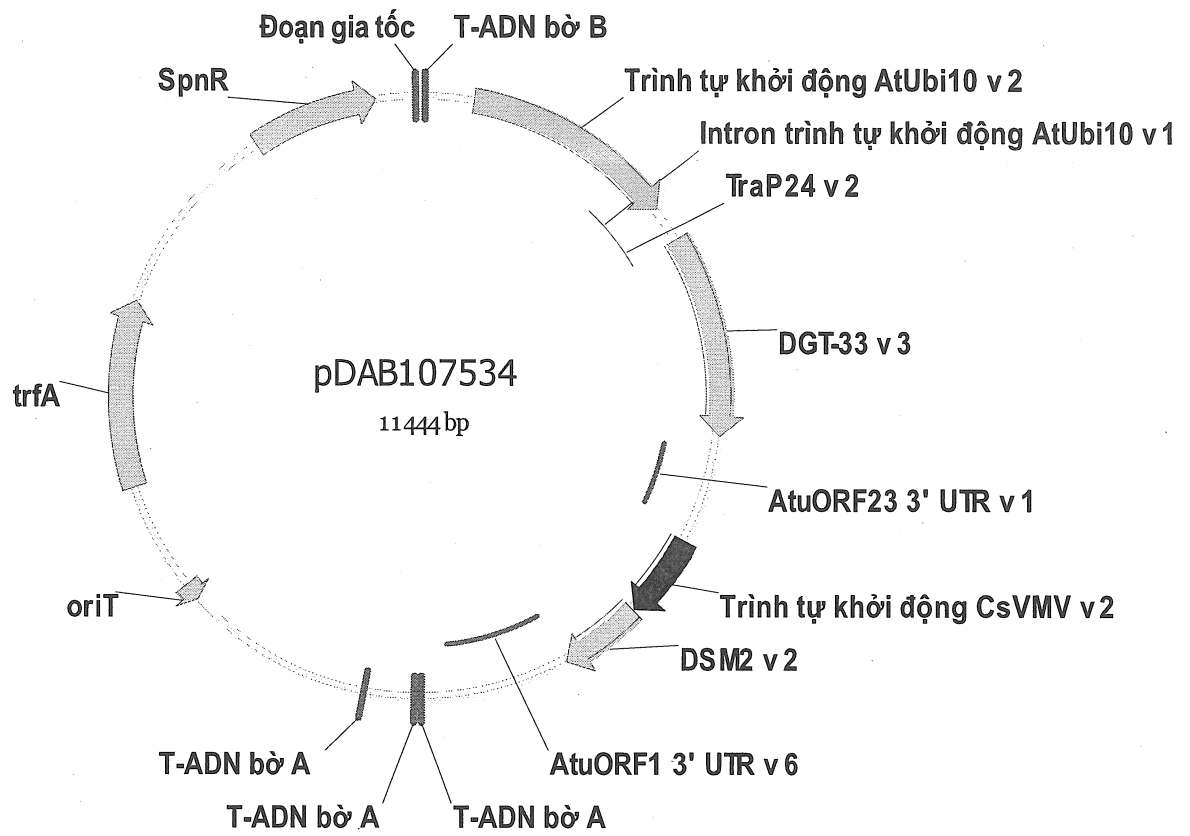


FIG. 12

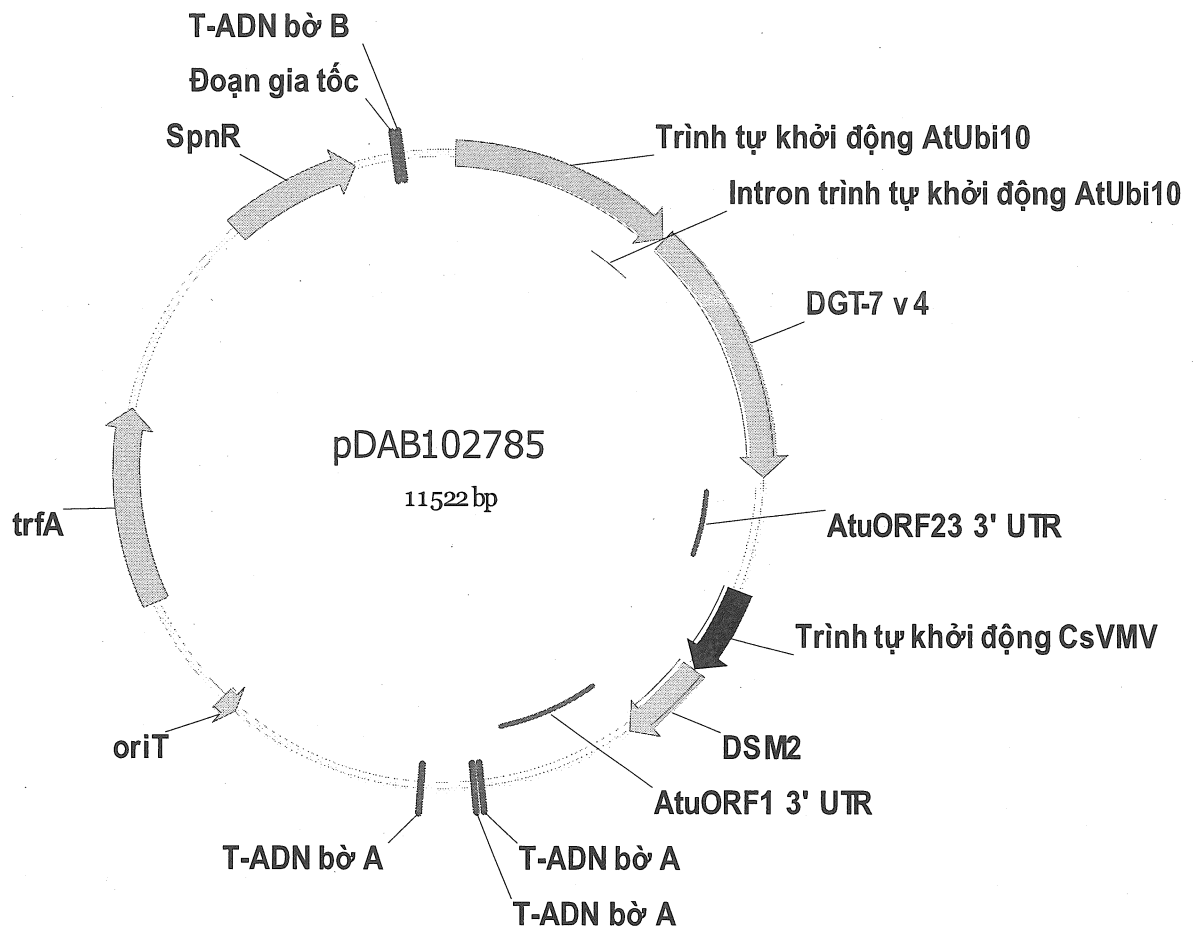
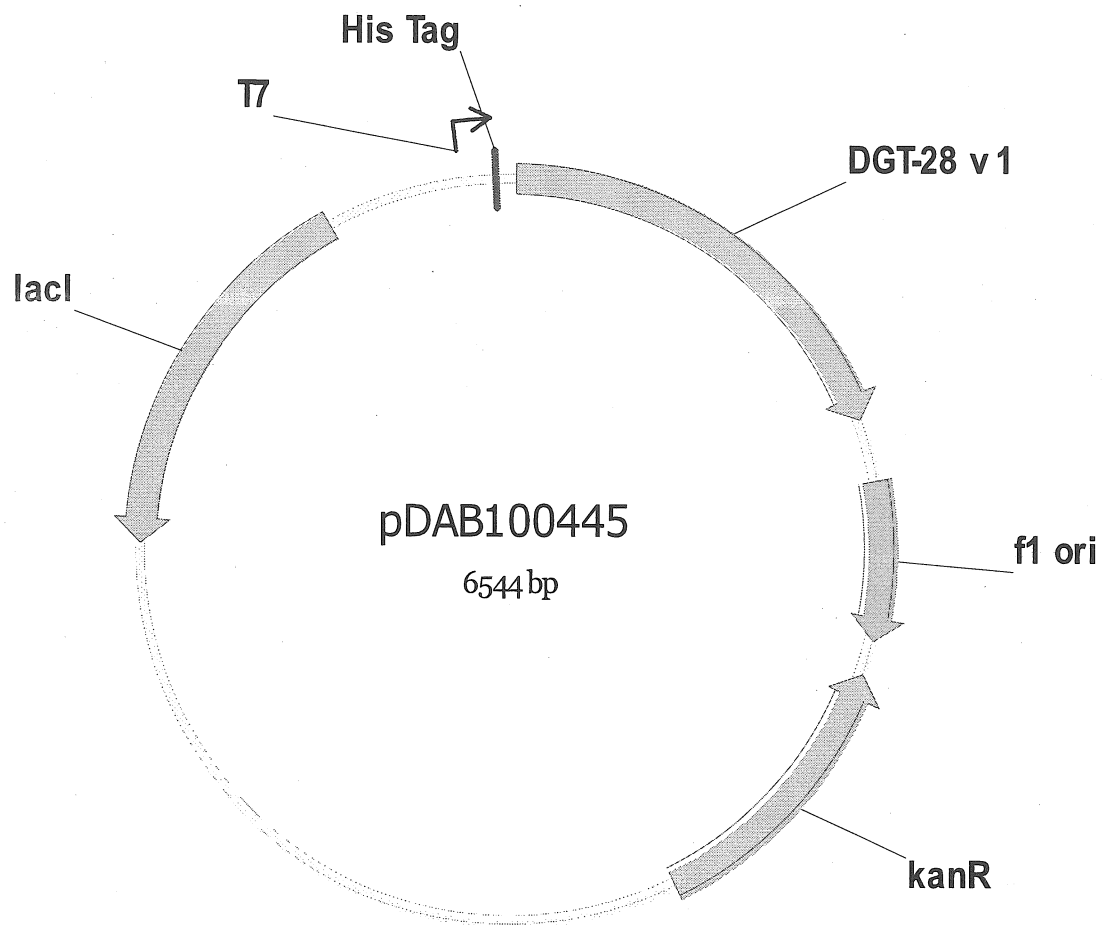
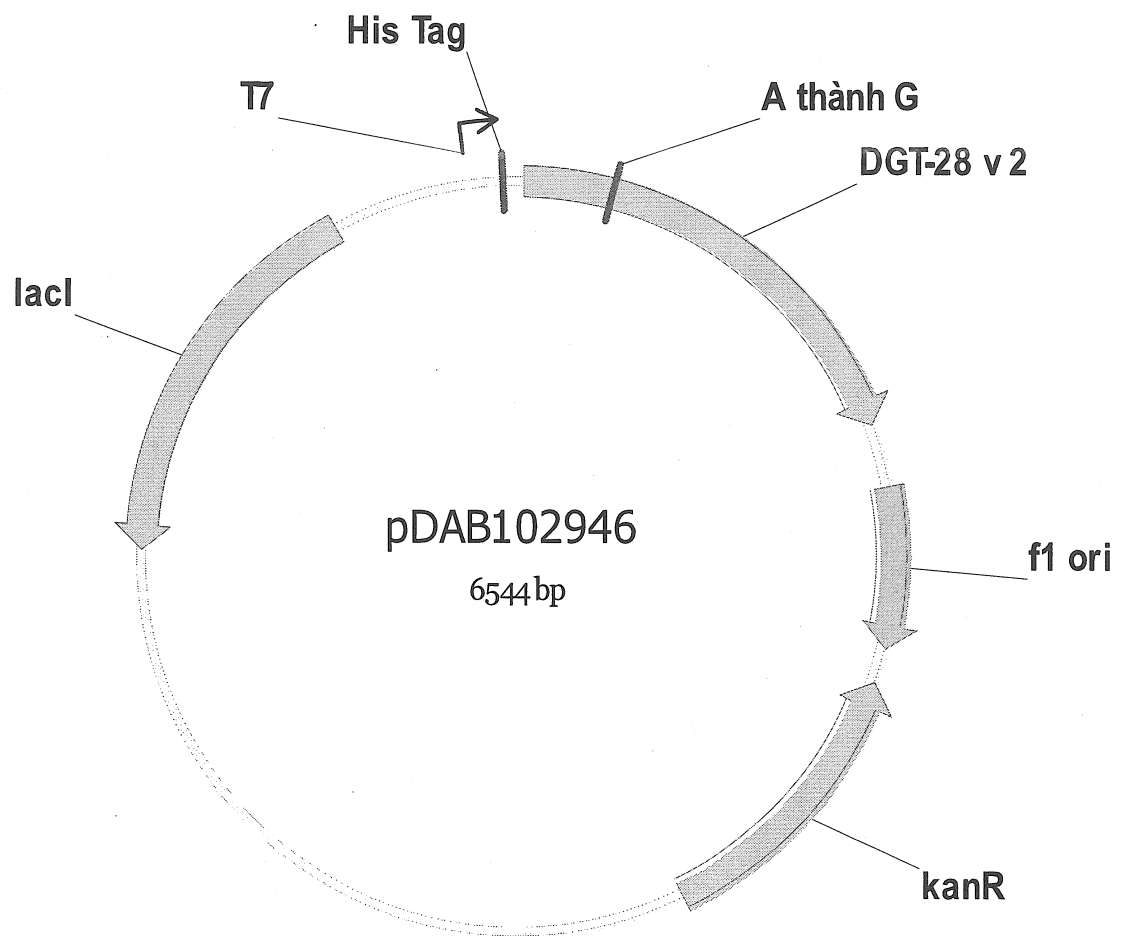
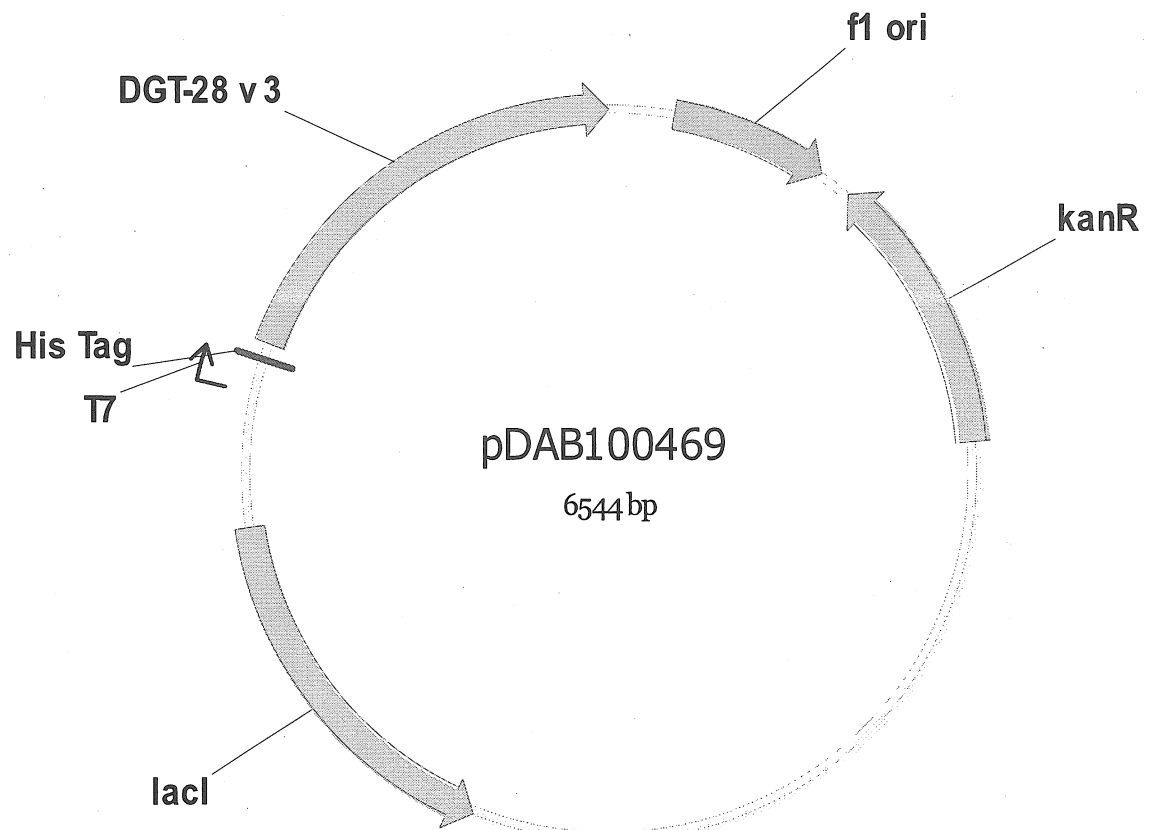
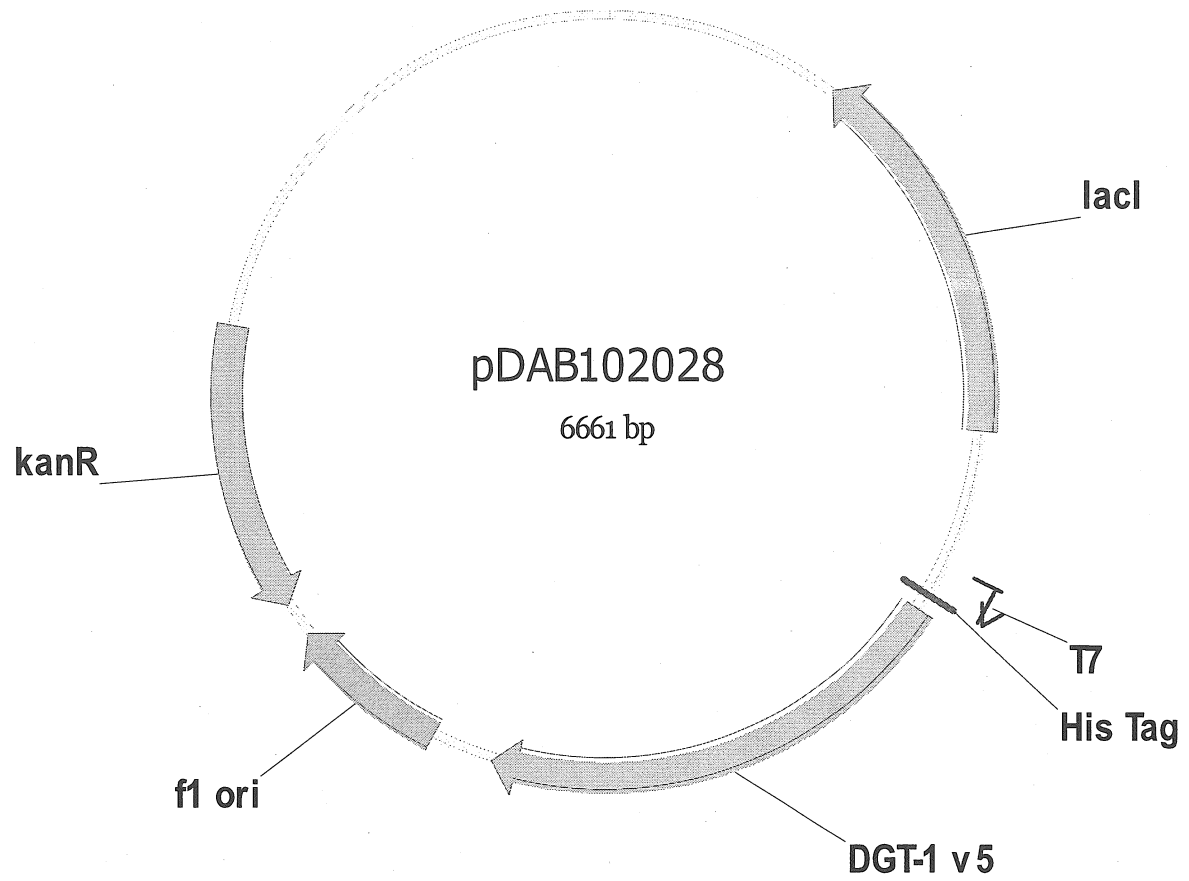


FIG. 13

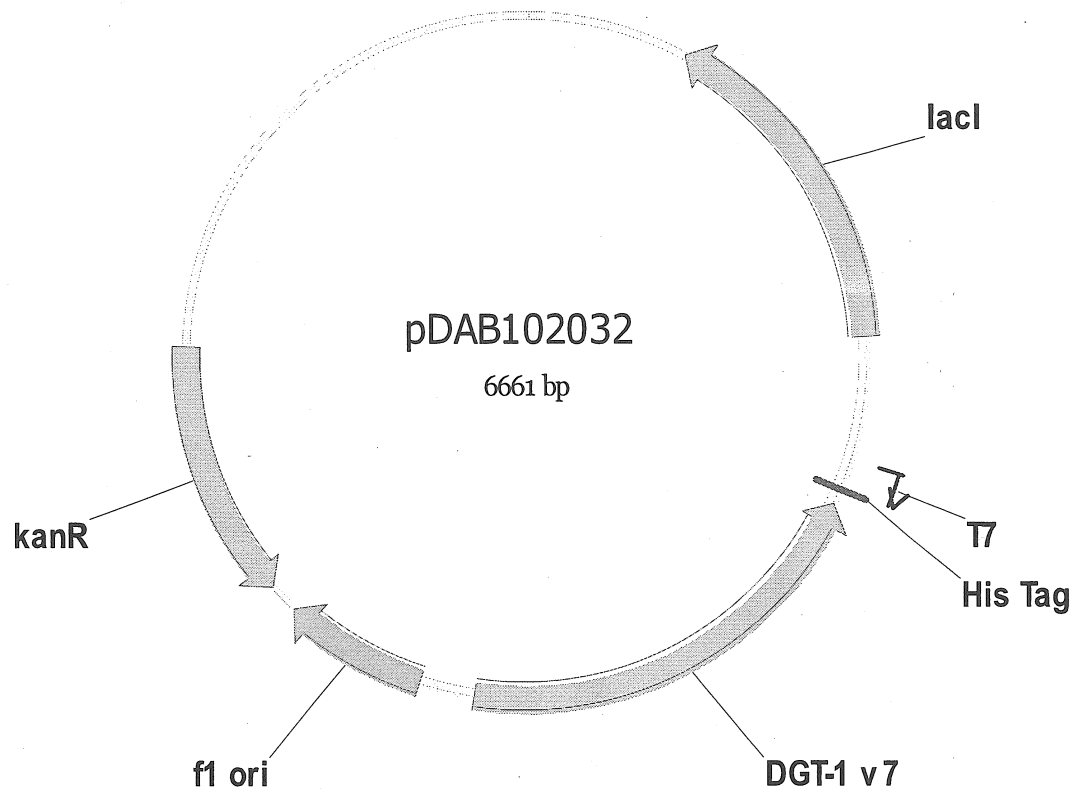
**FIG. 14**

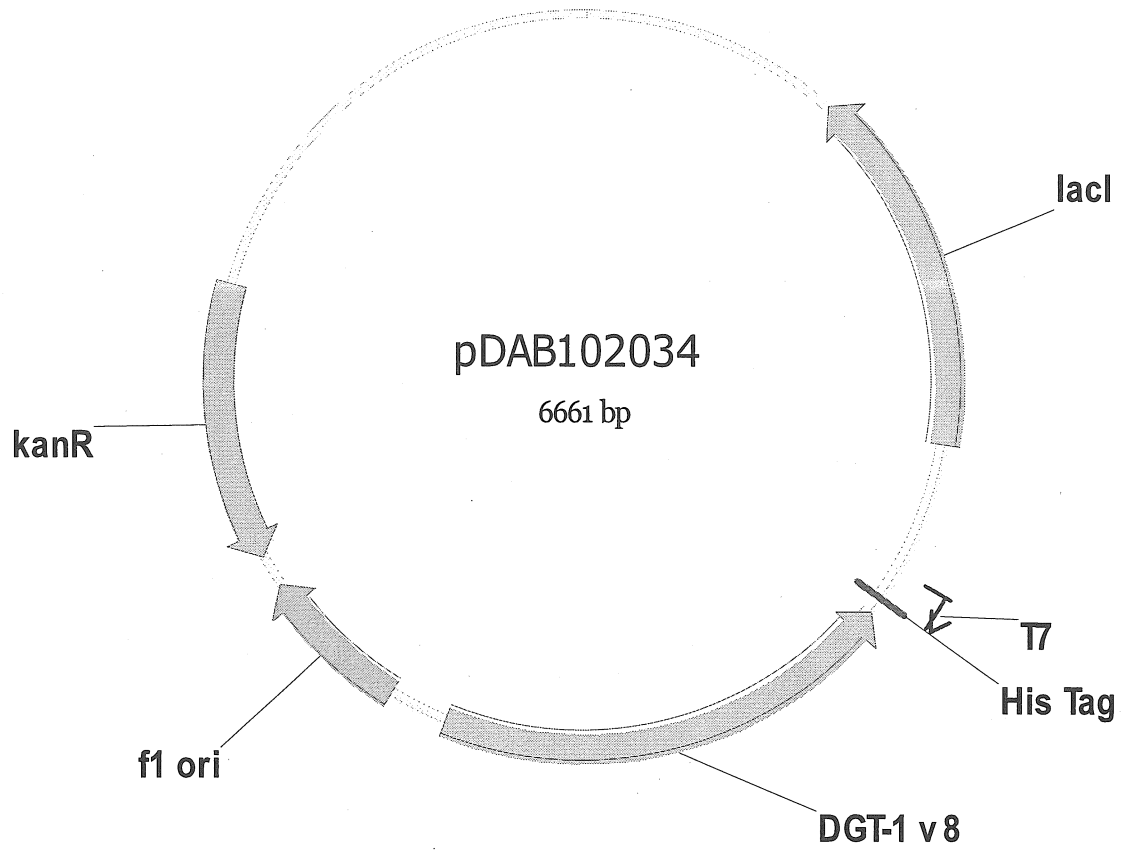
**FIG. 15**

**FIG. 16**

**FIG. 17**

**FIG. 18**

**FIG. 19**

**FIG. 20**

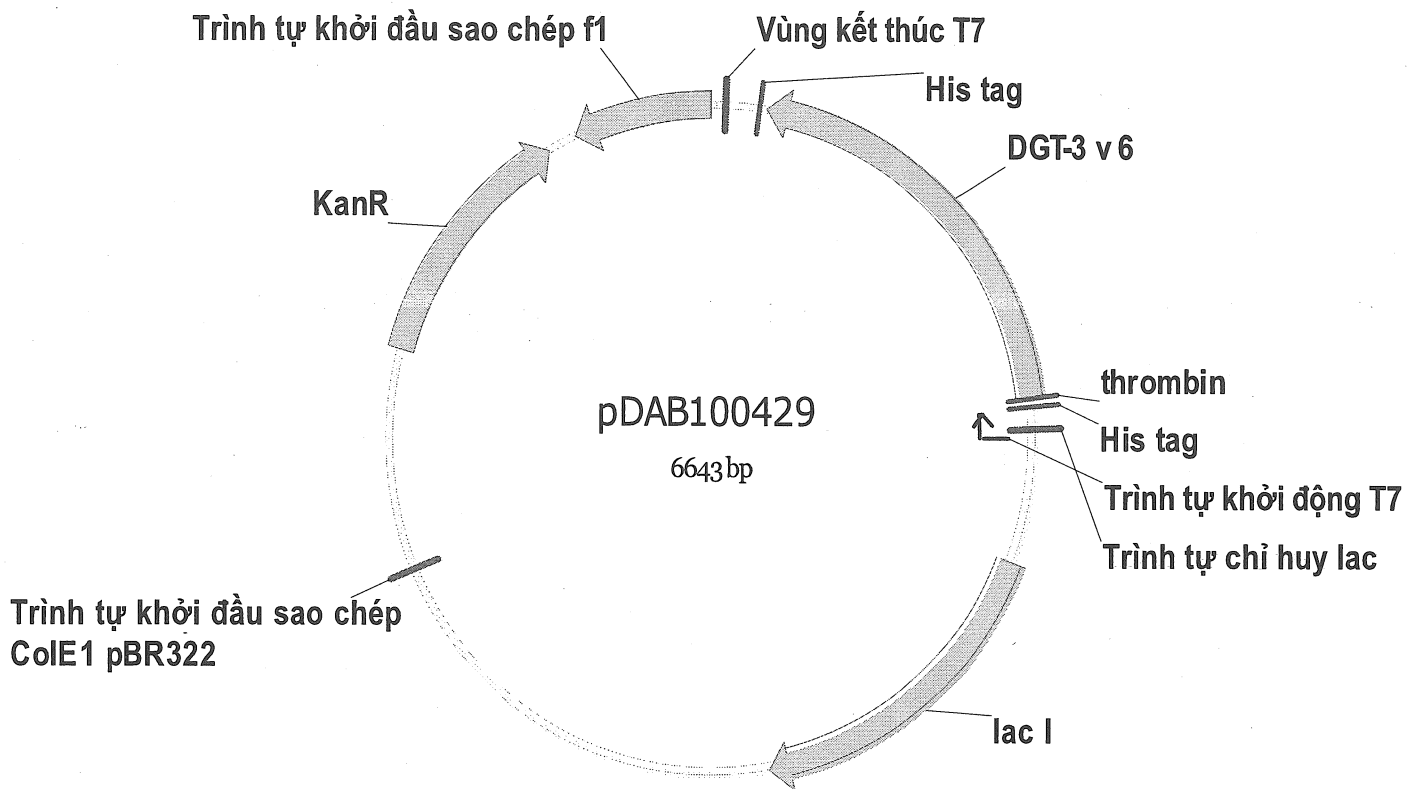
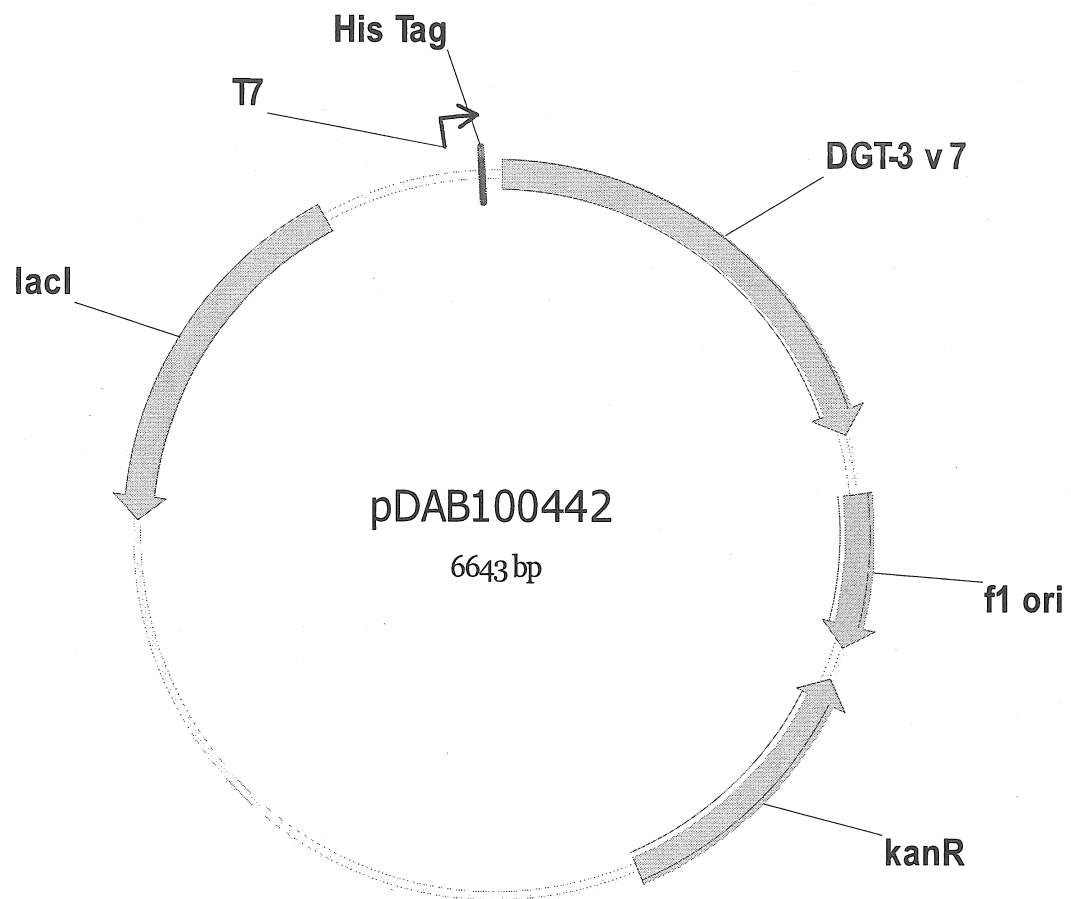
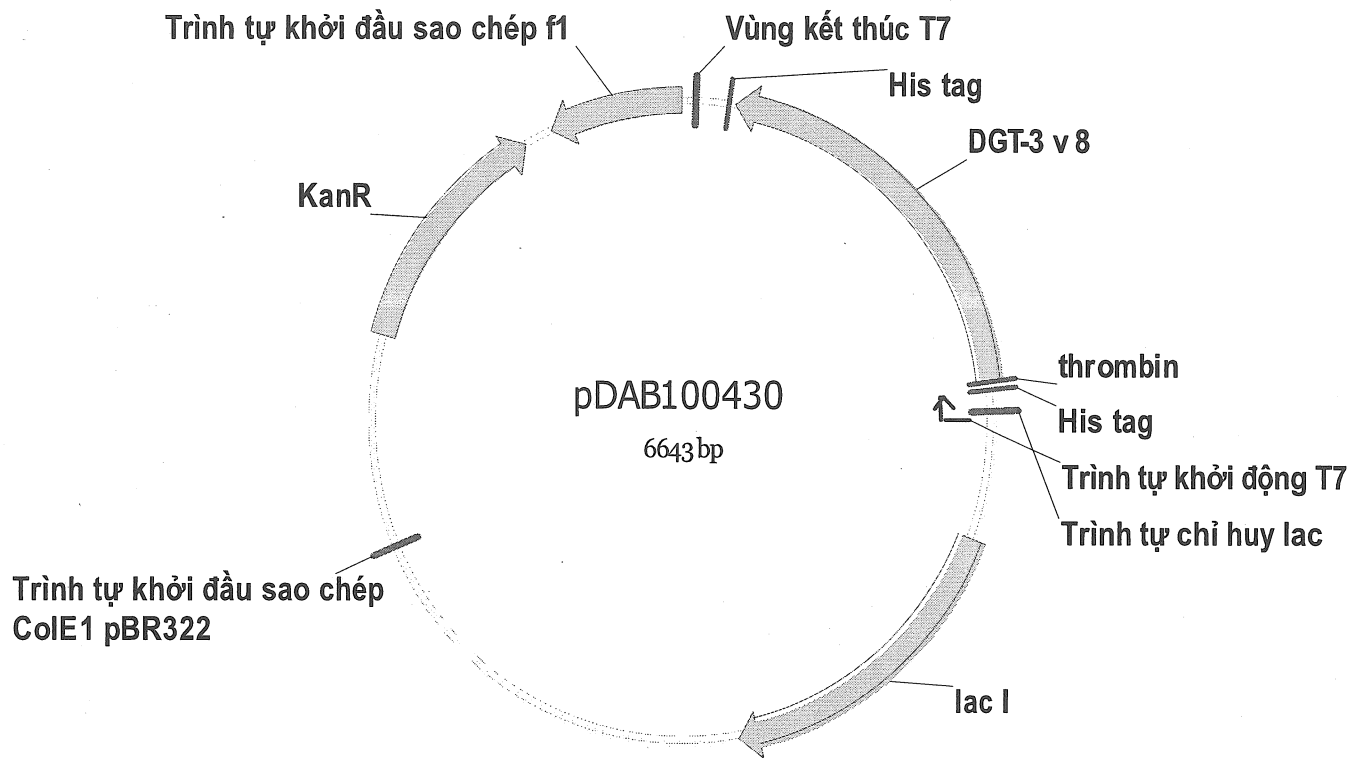
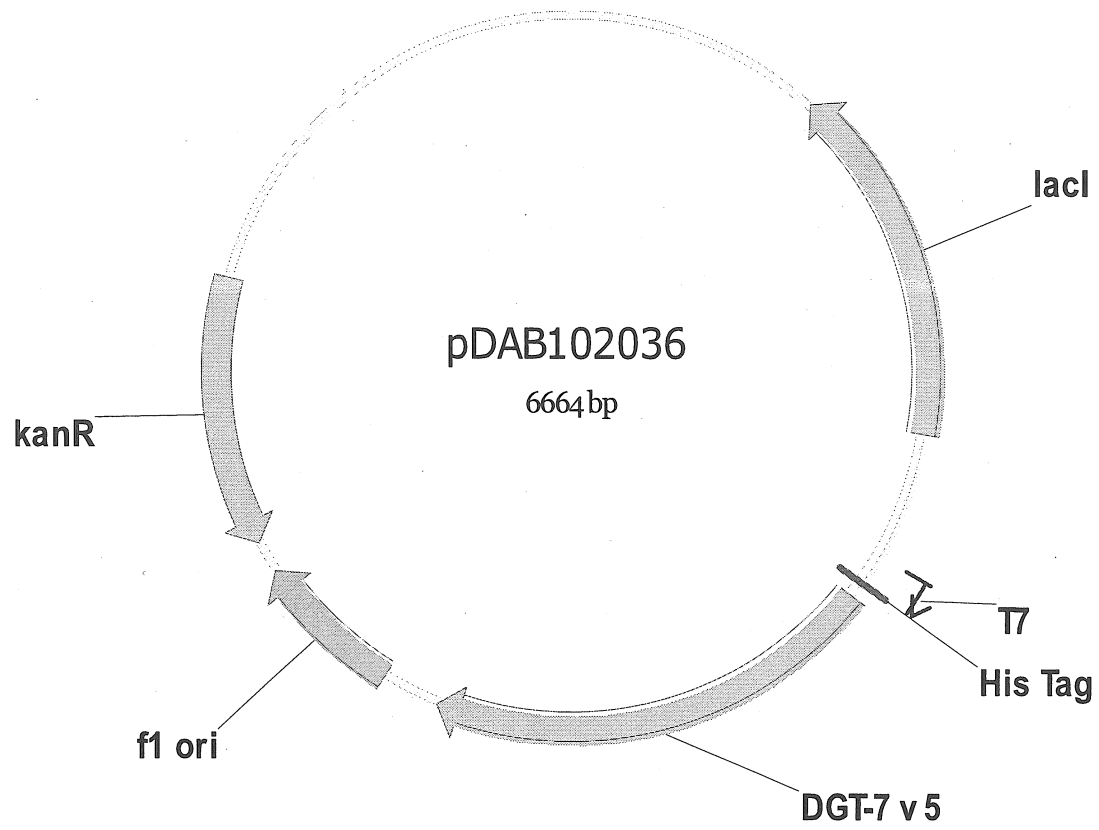
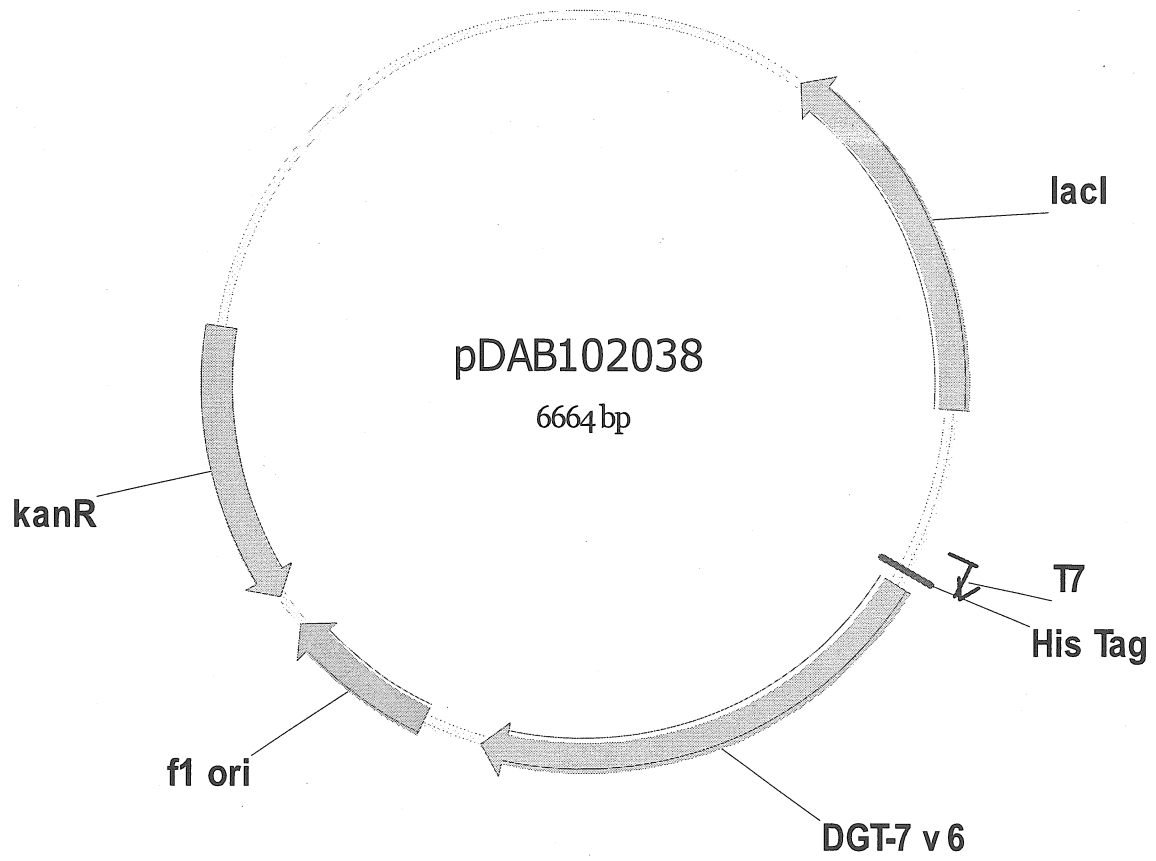


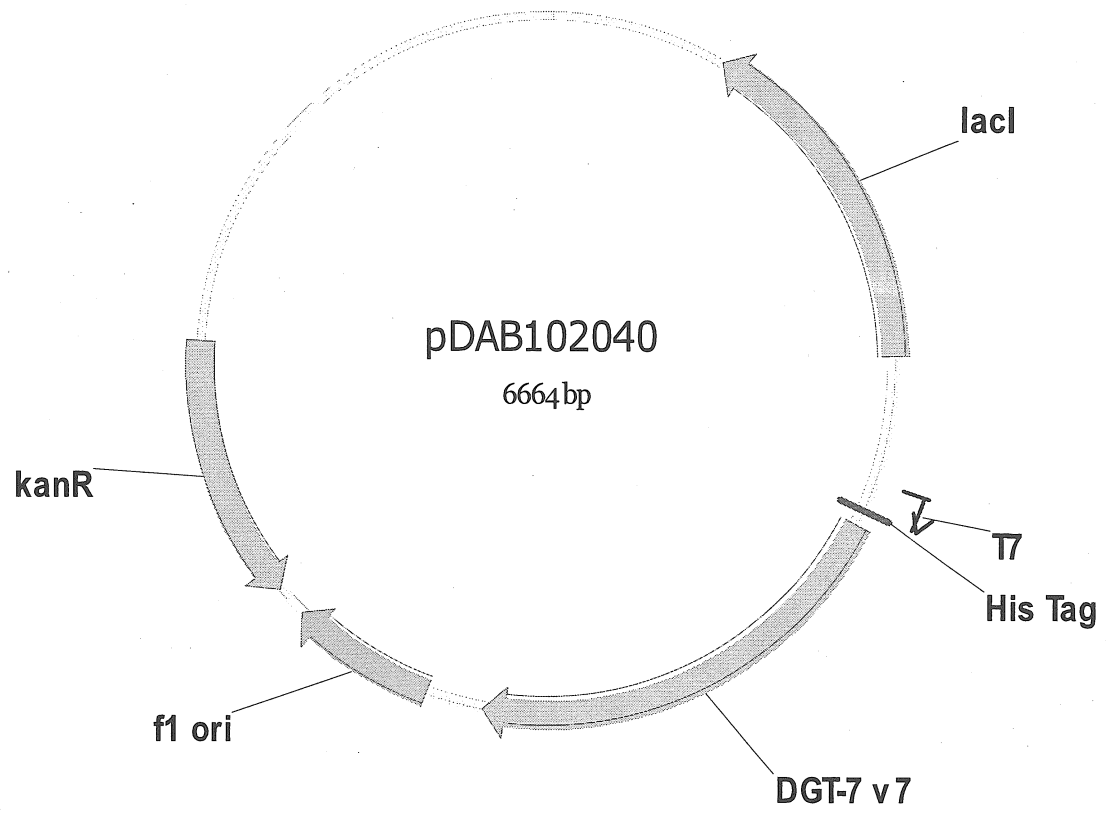
FIG. 21

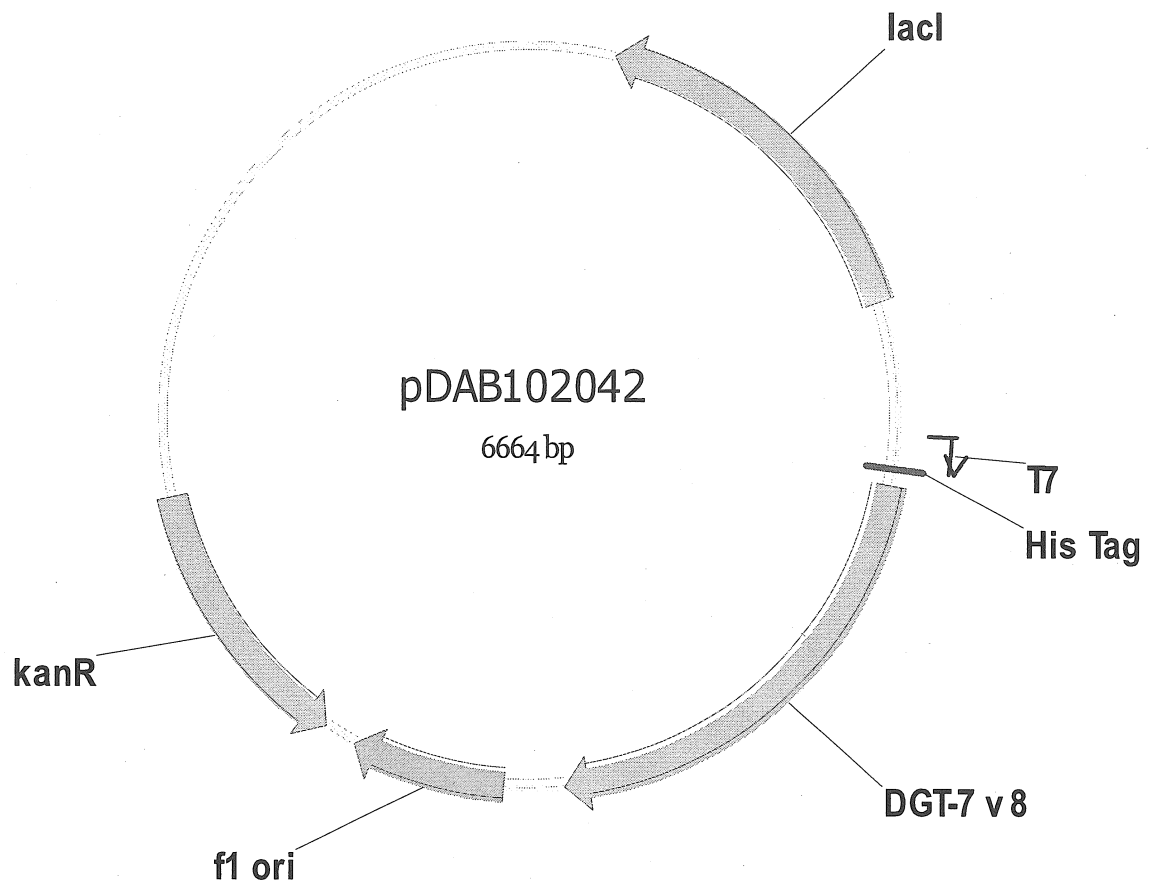
**FIG. 22**

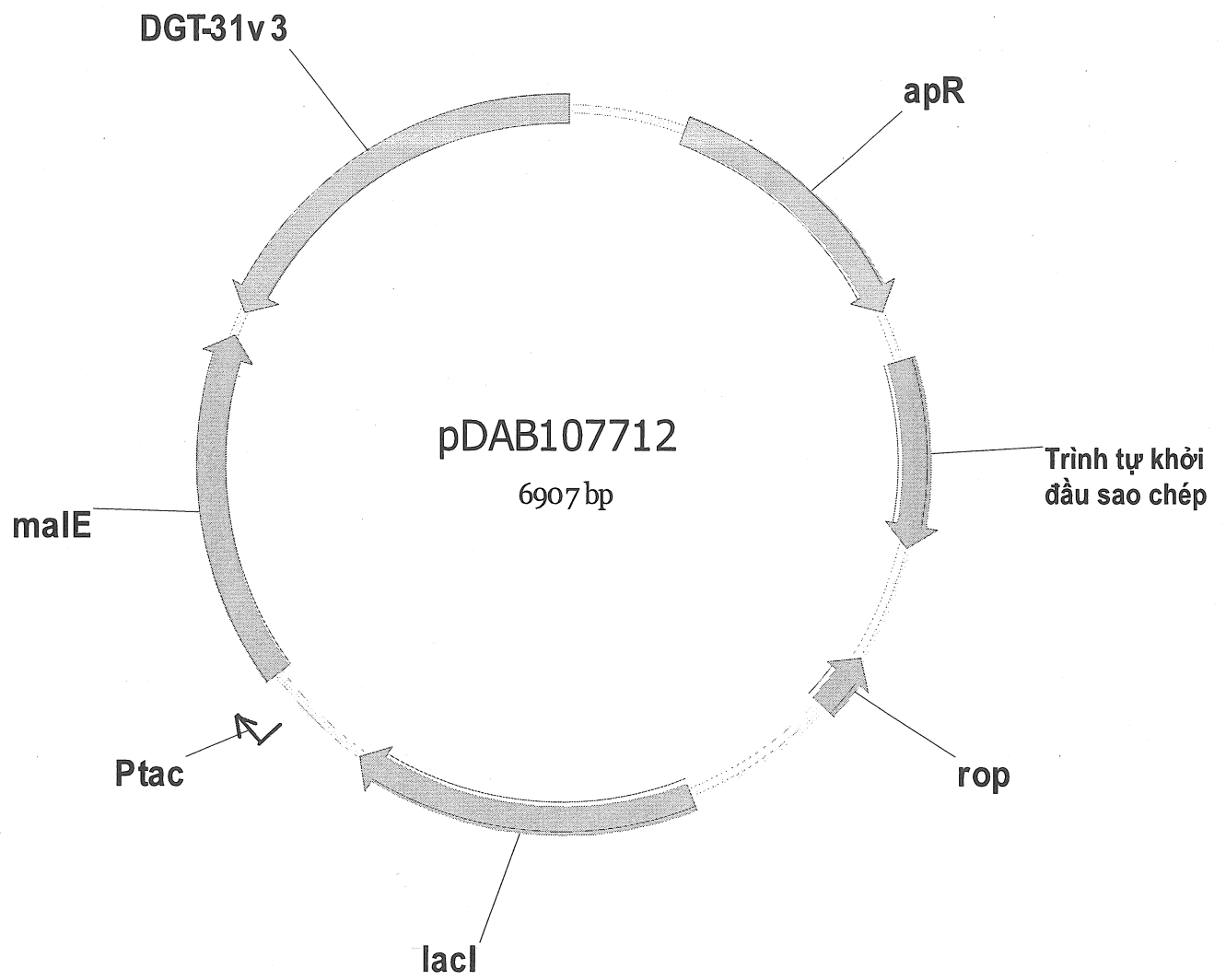
**FIG. 23**

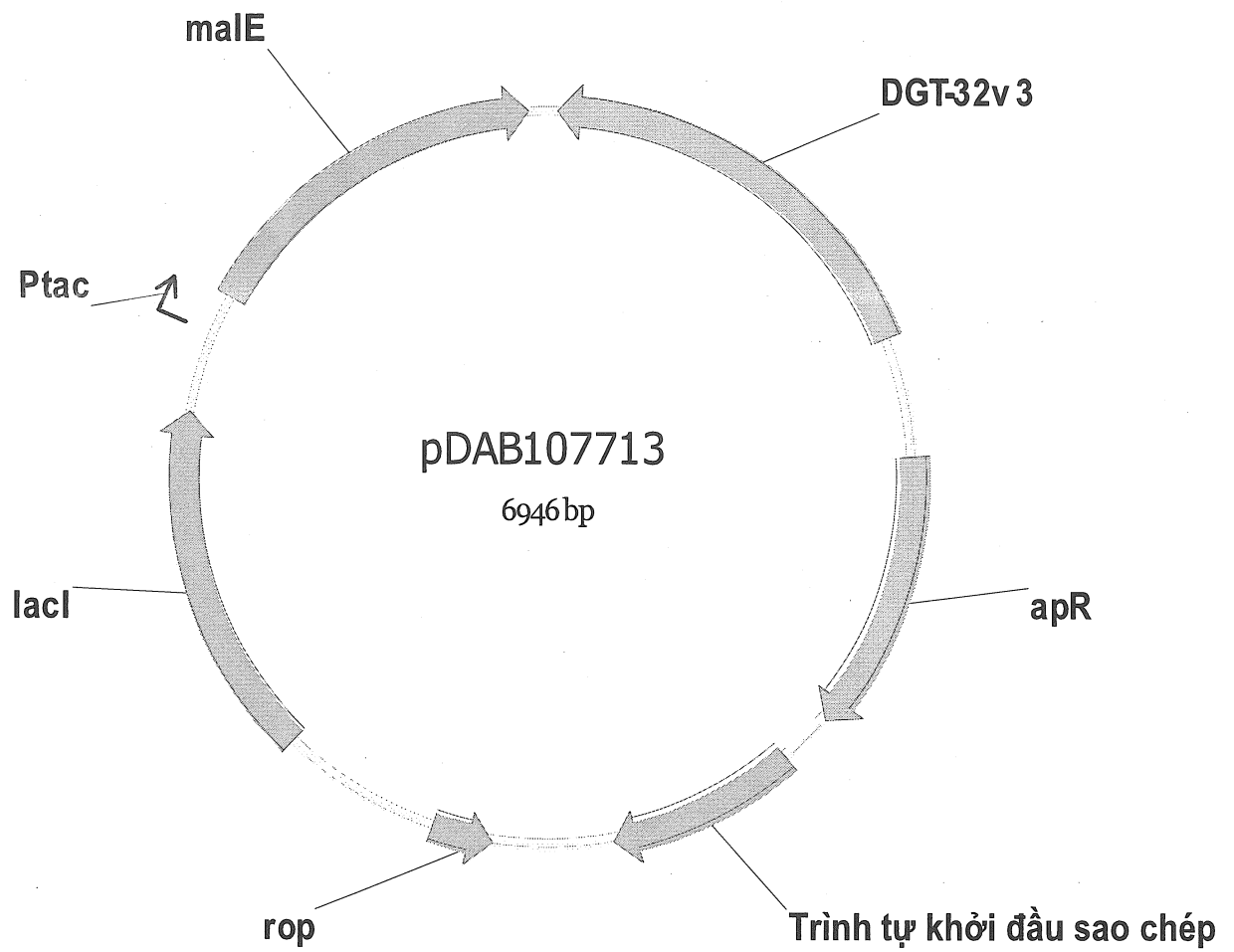
**FIG. 24**

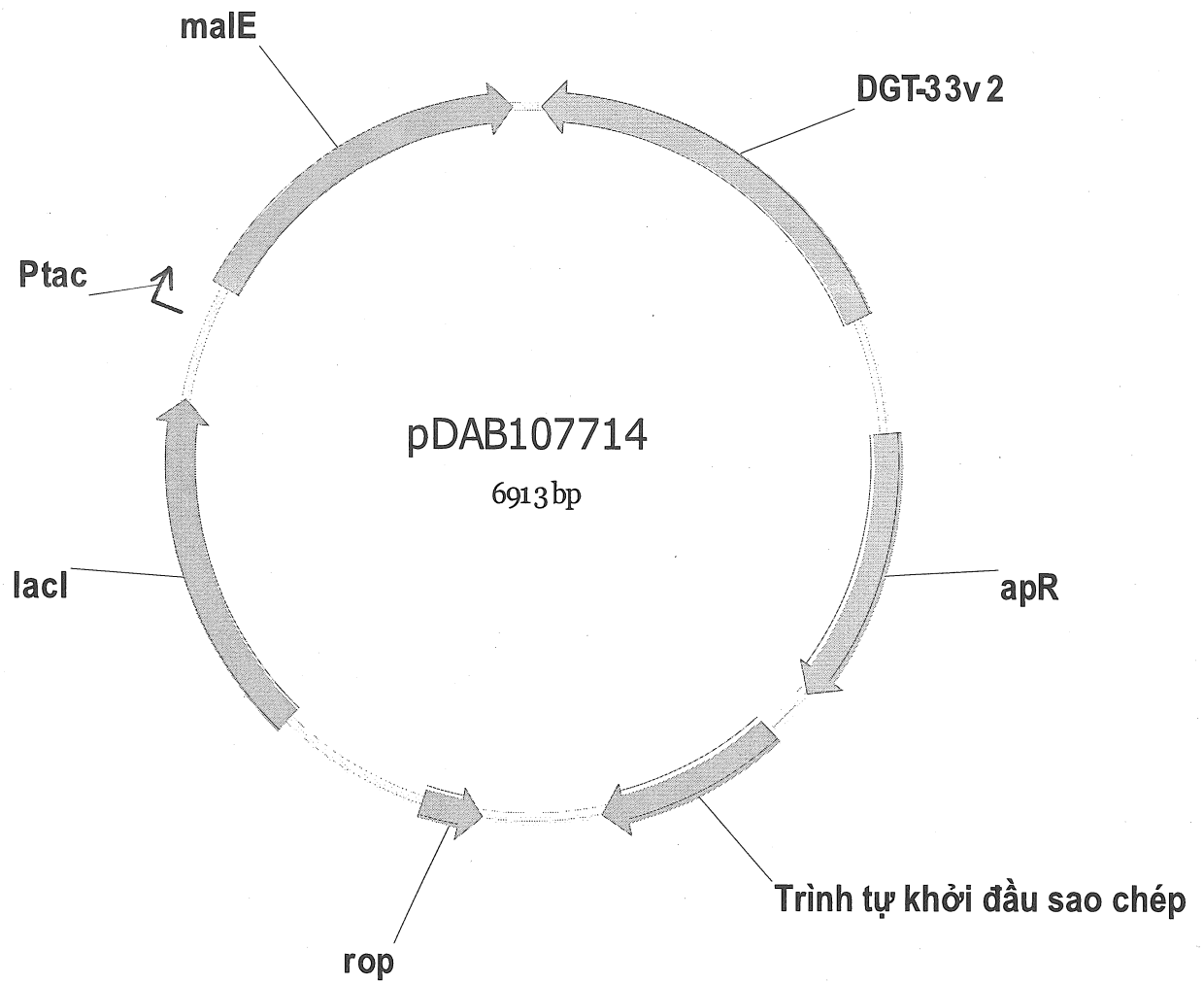
**FIG. 25**

**FIG. 26**

**FIG. 27**

**FIG. 28**

**FIG. 29**

**FIG. 30**

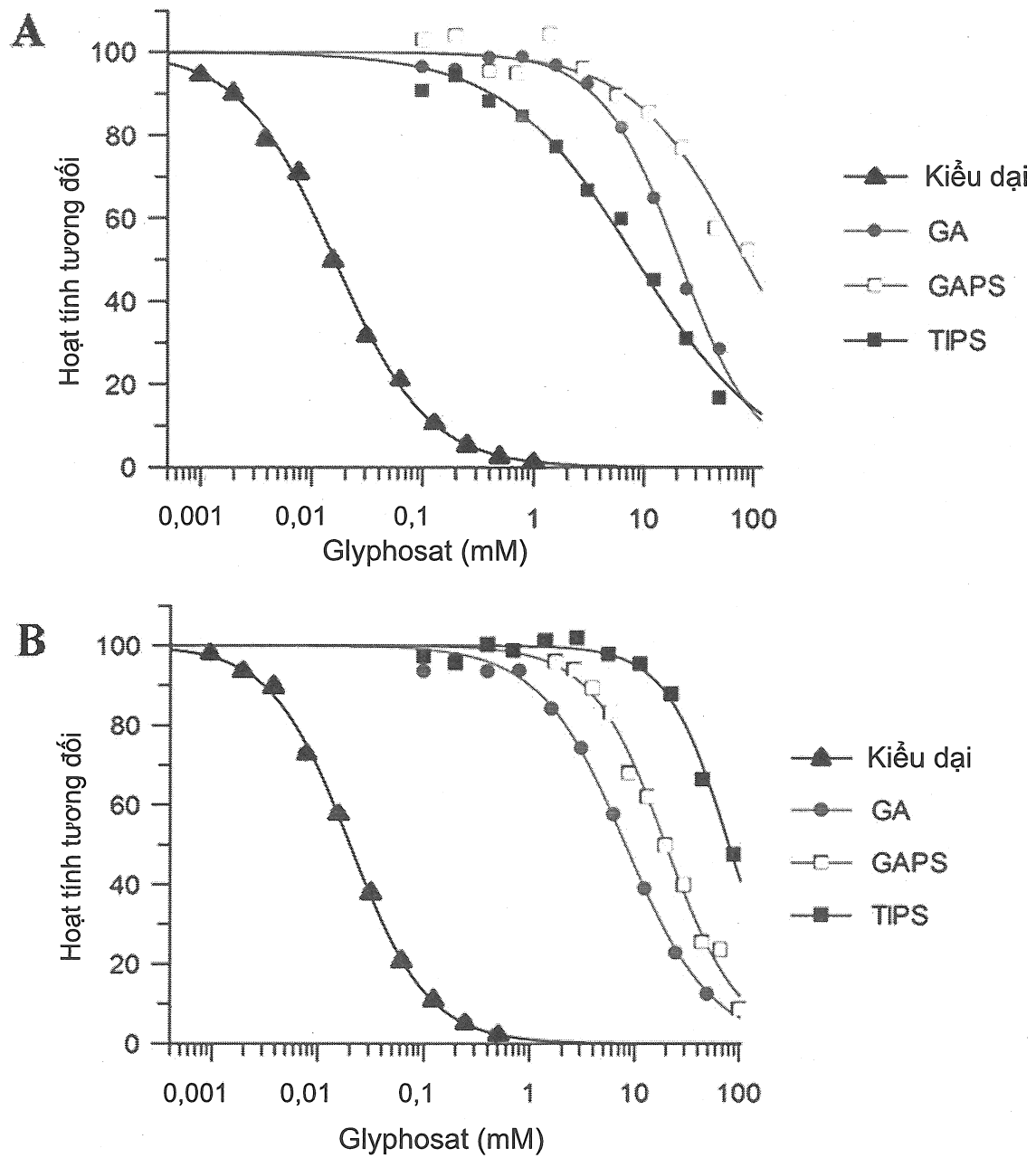


FIG. 31

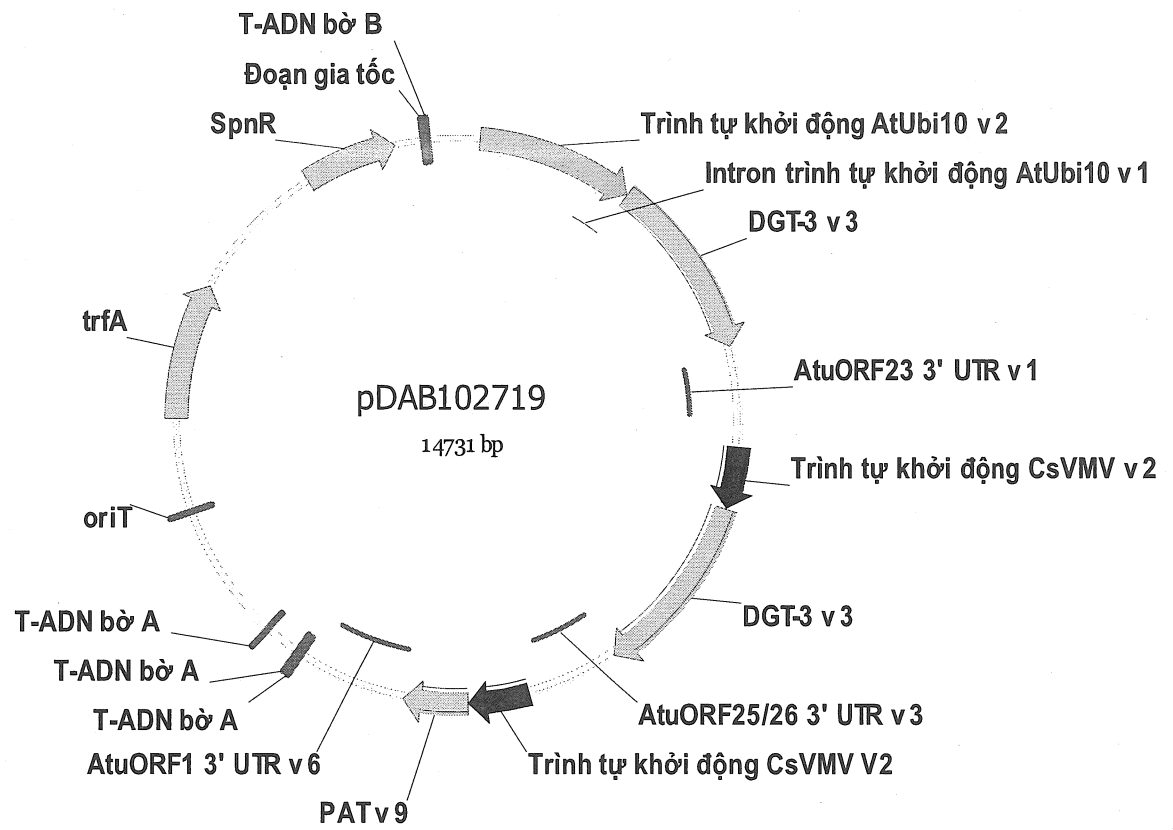
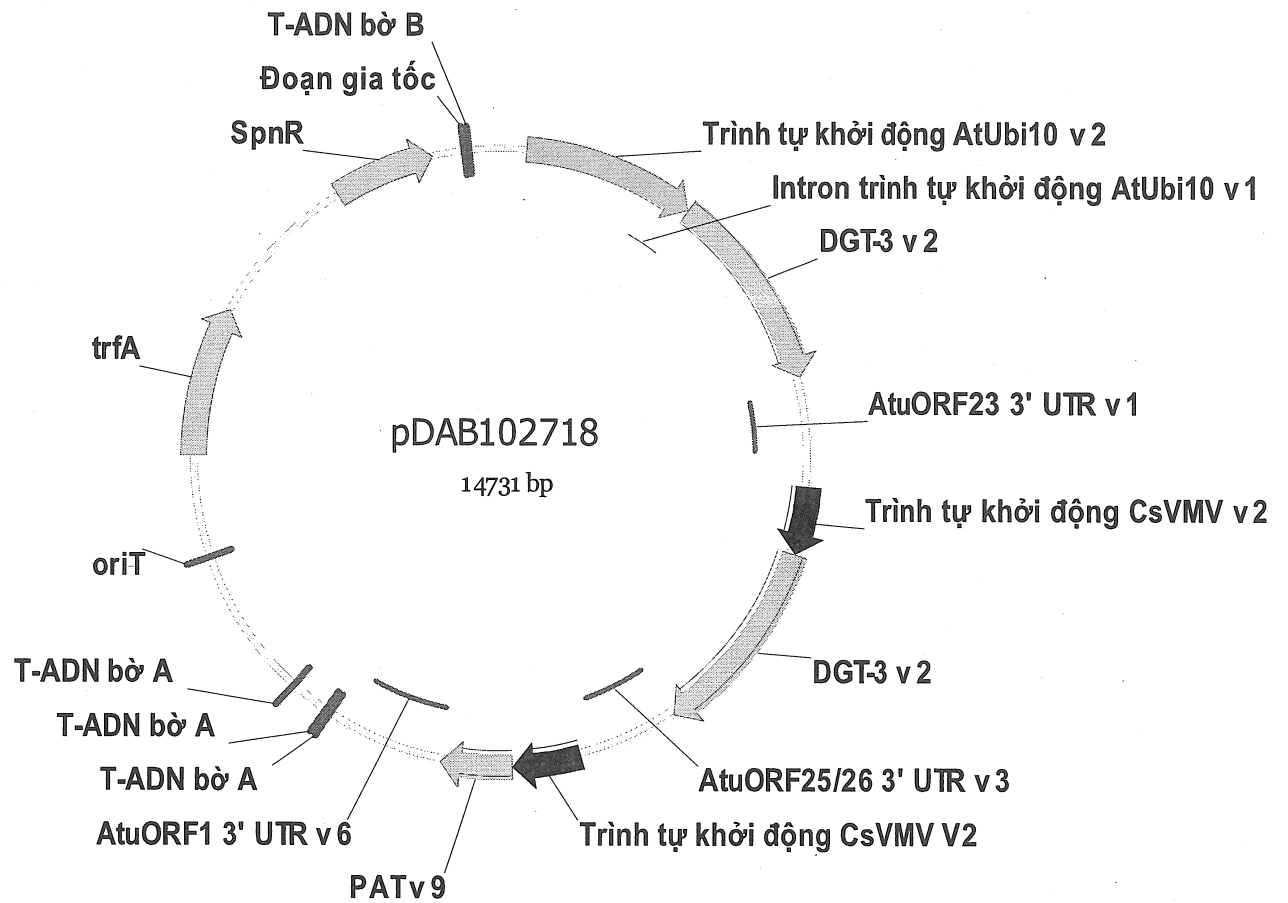


FIG. 32

**FIG. 33**

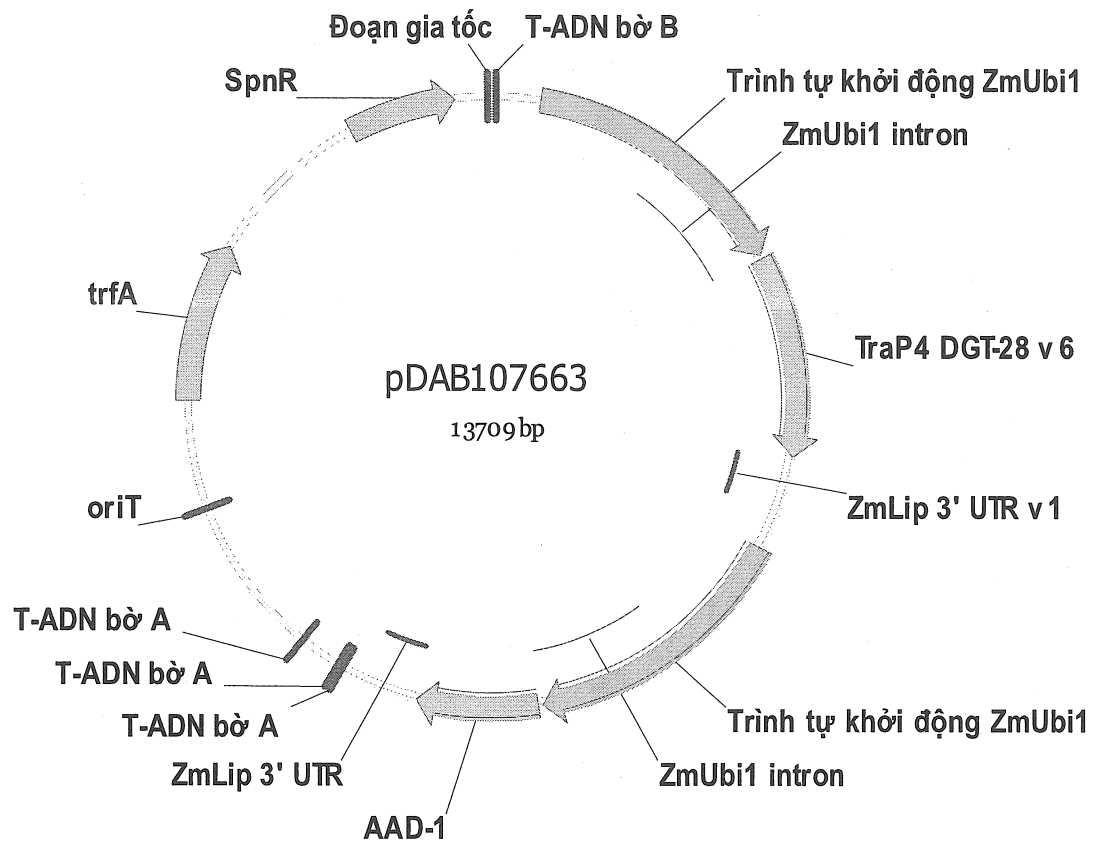


FIG. 34

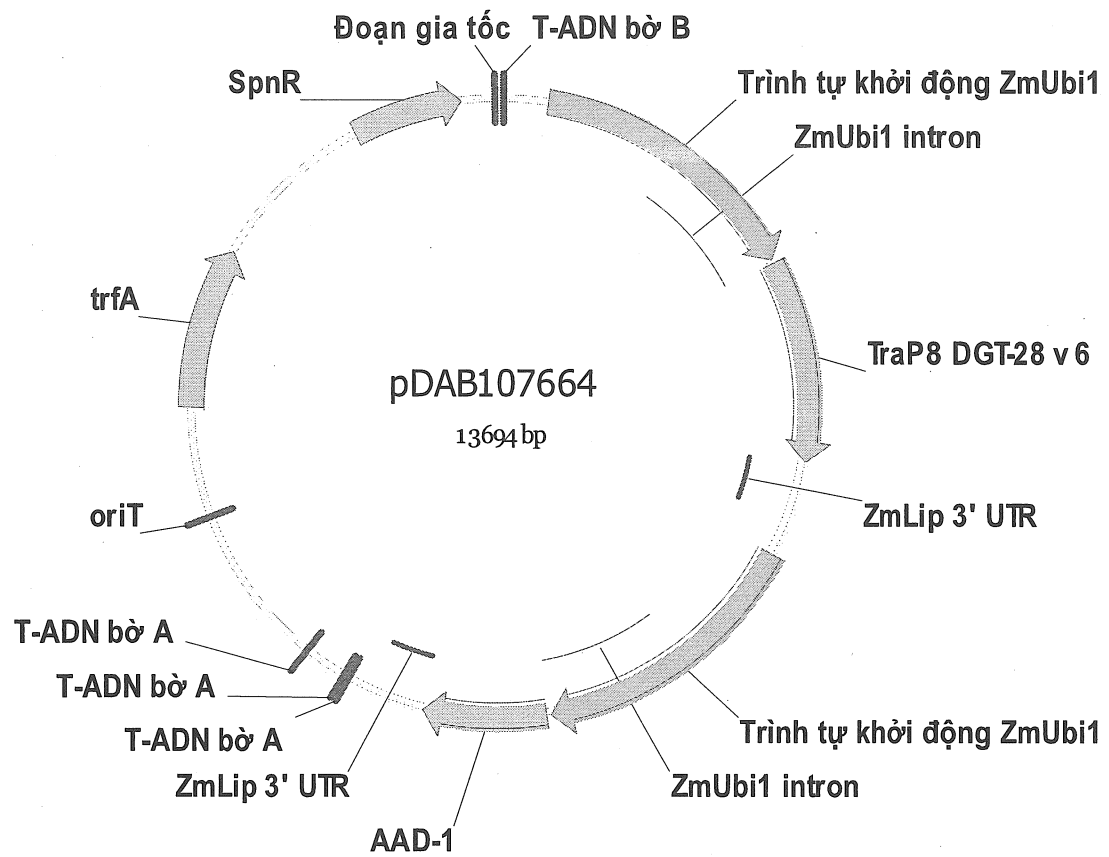


FIG. 35

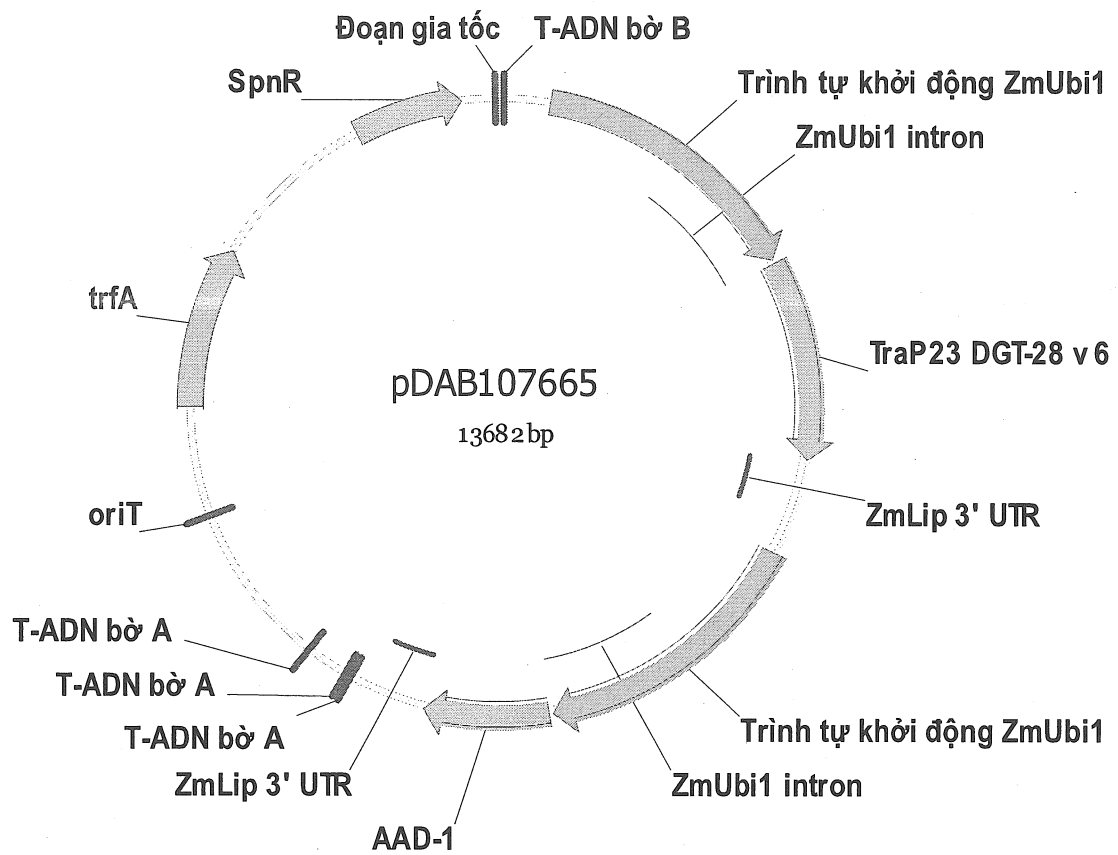


FIG. 36

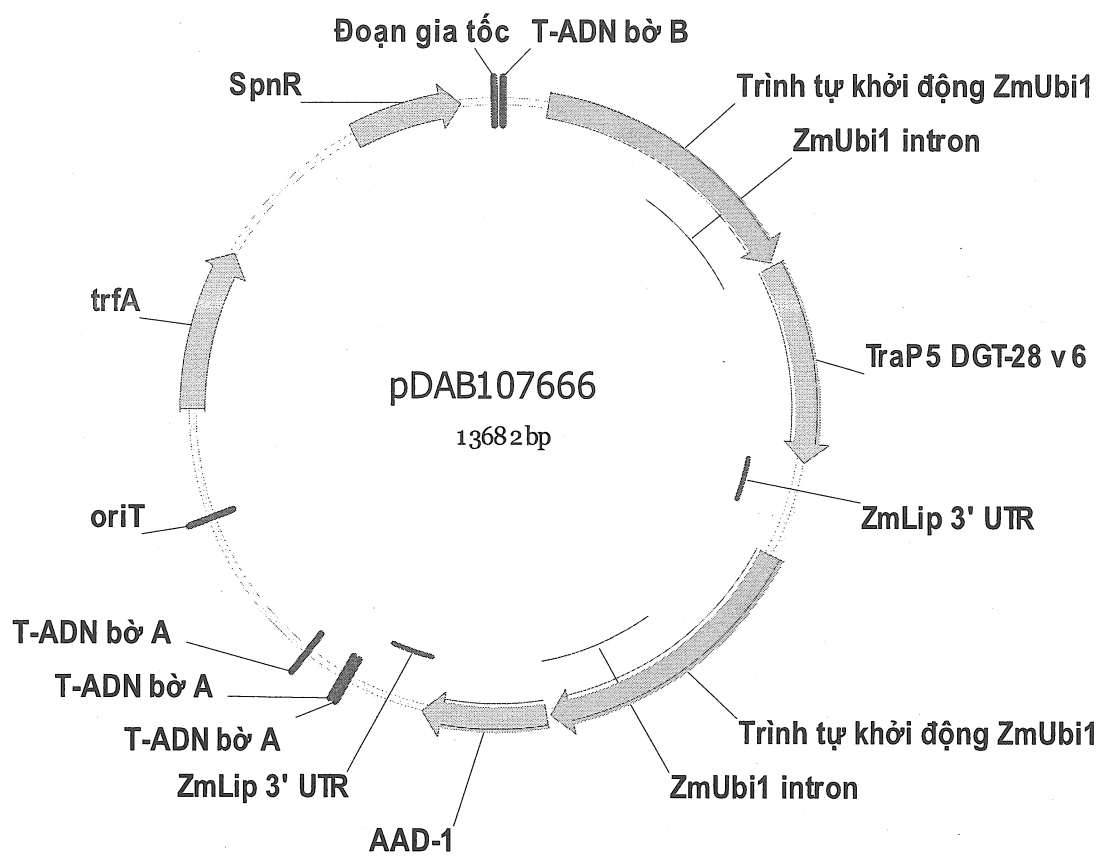


FIG. 37

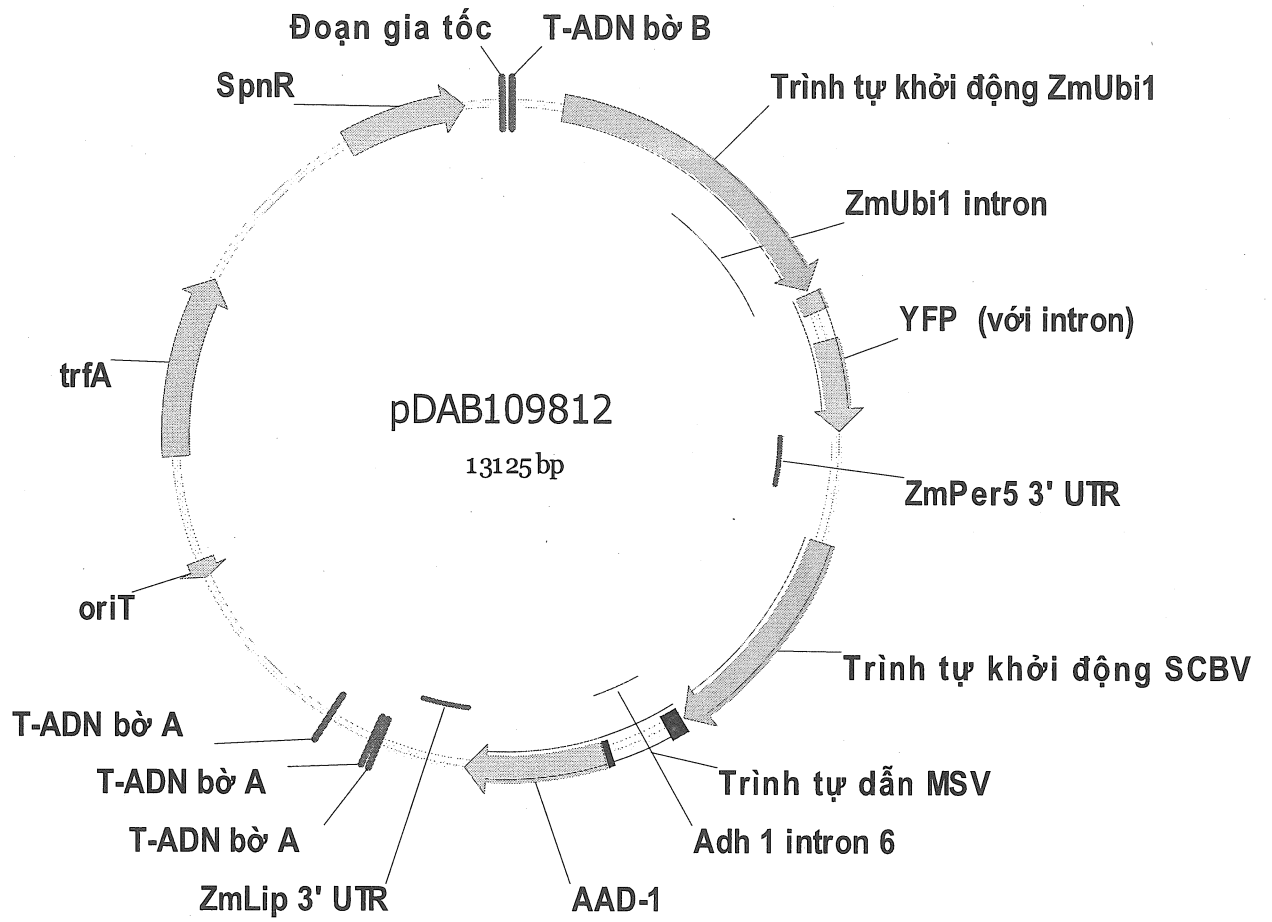


FIG. 38

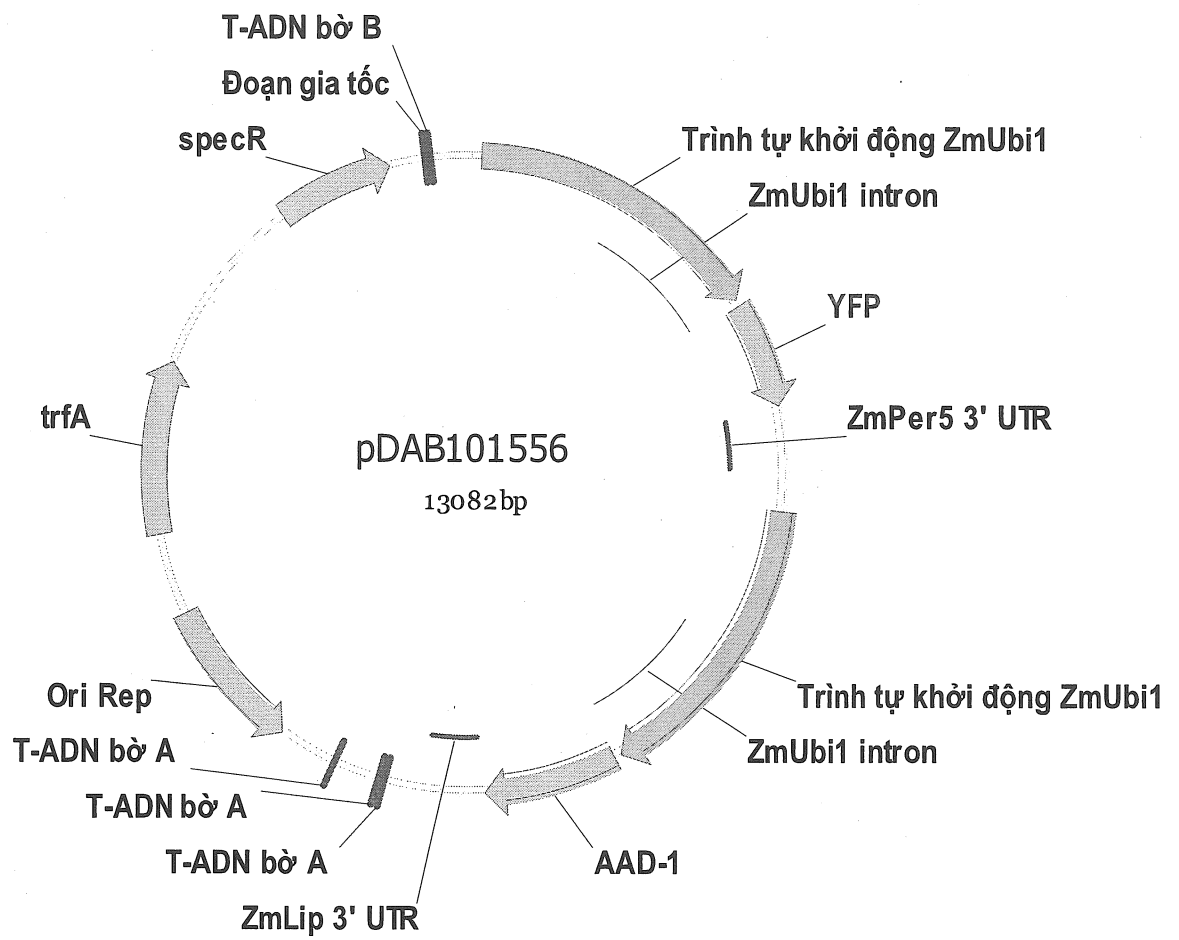


FIG. 39

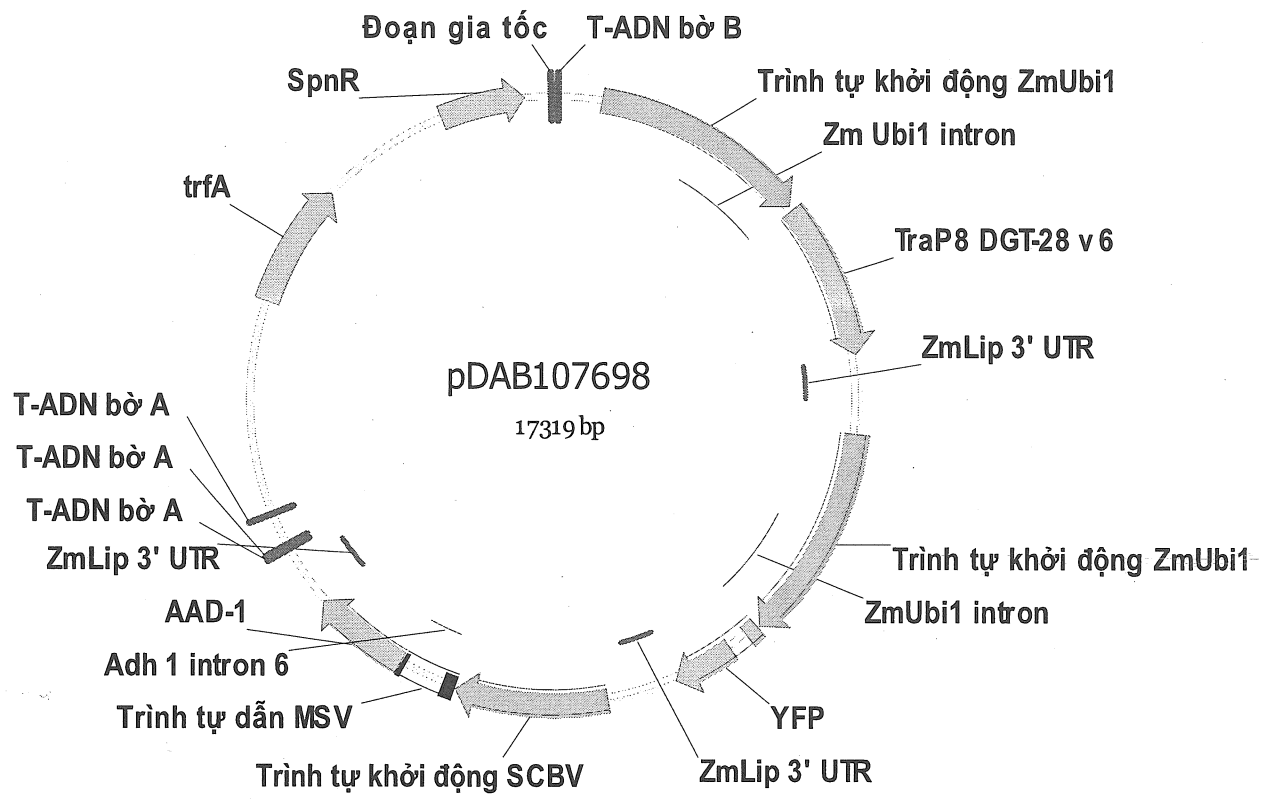


FIG.40

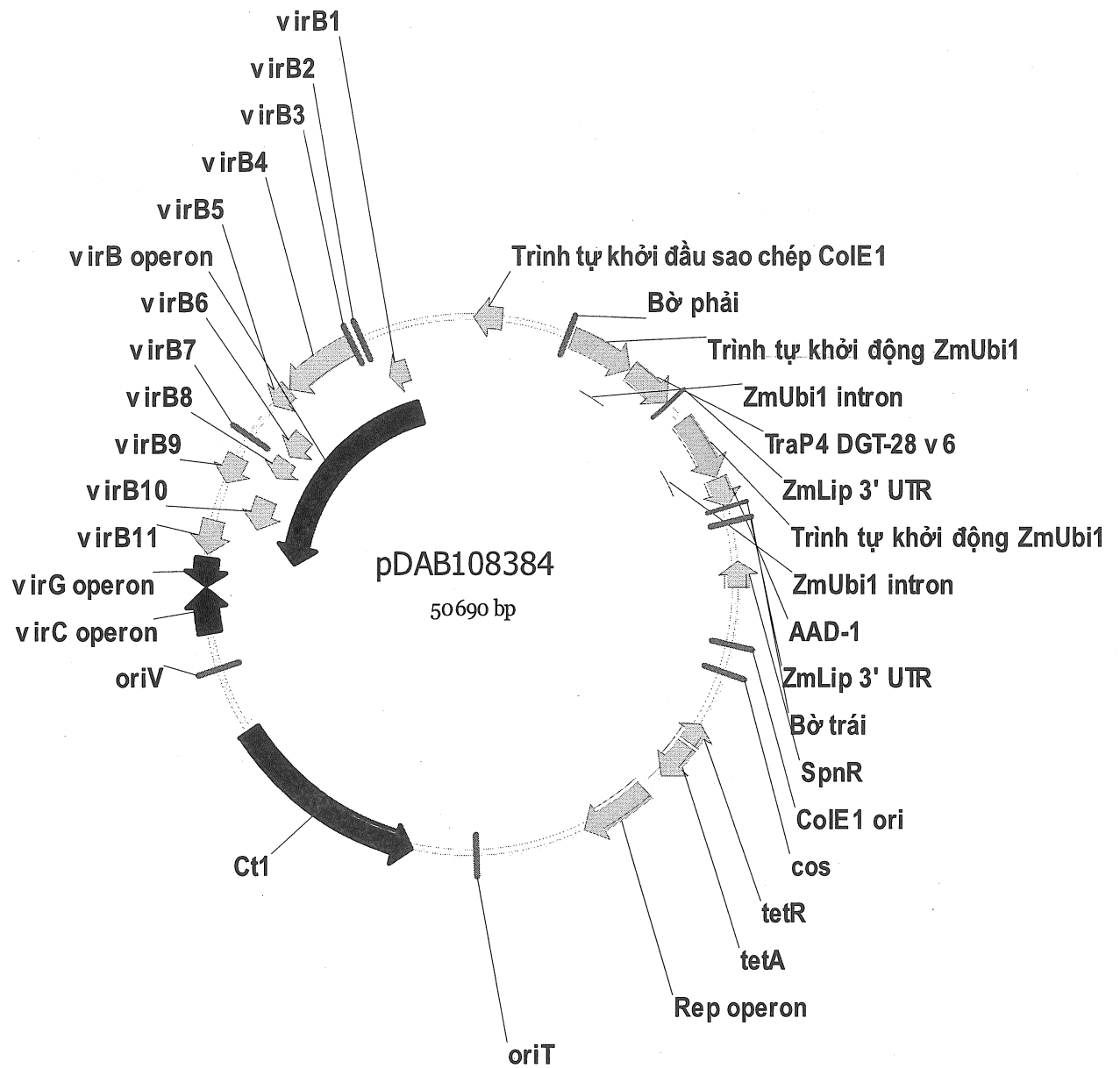


FIG. 41

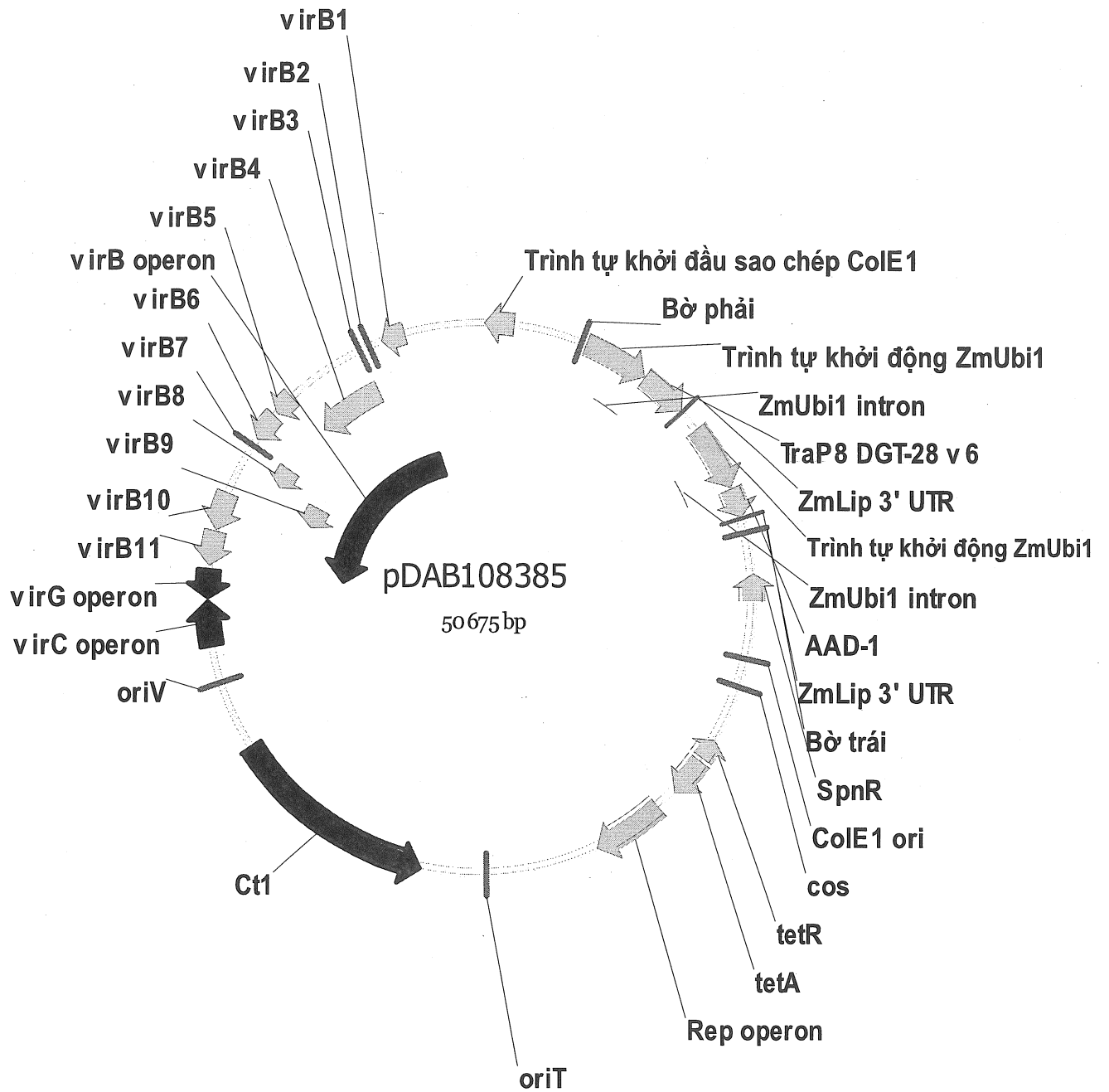


FIG. 42

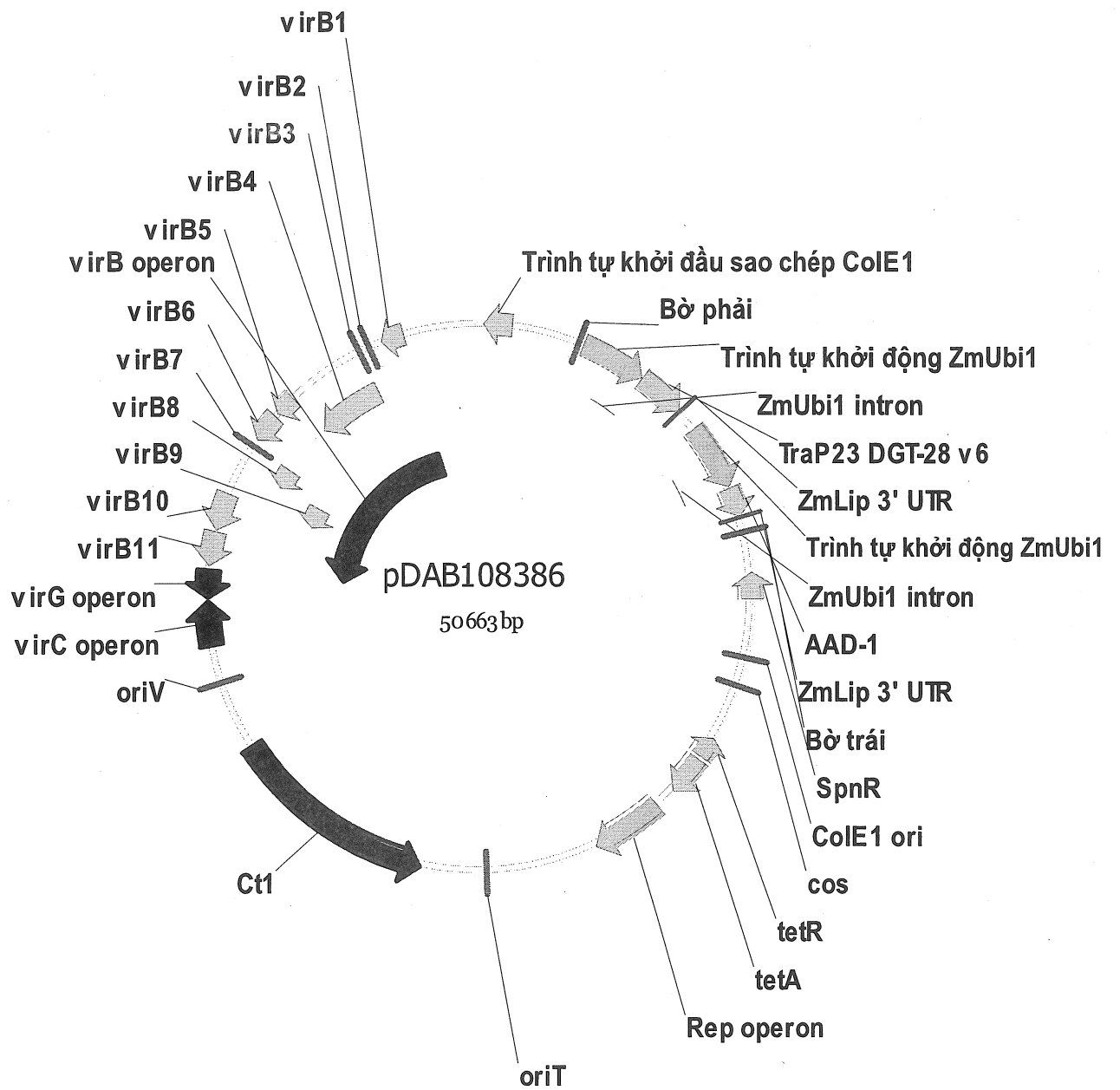


FIG. 43

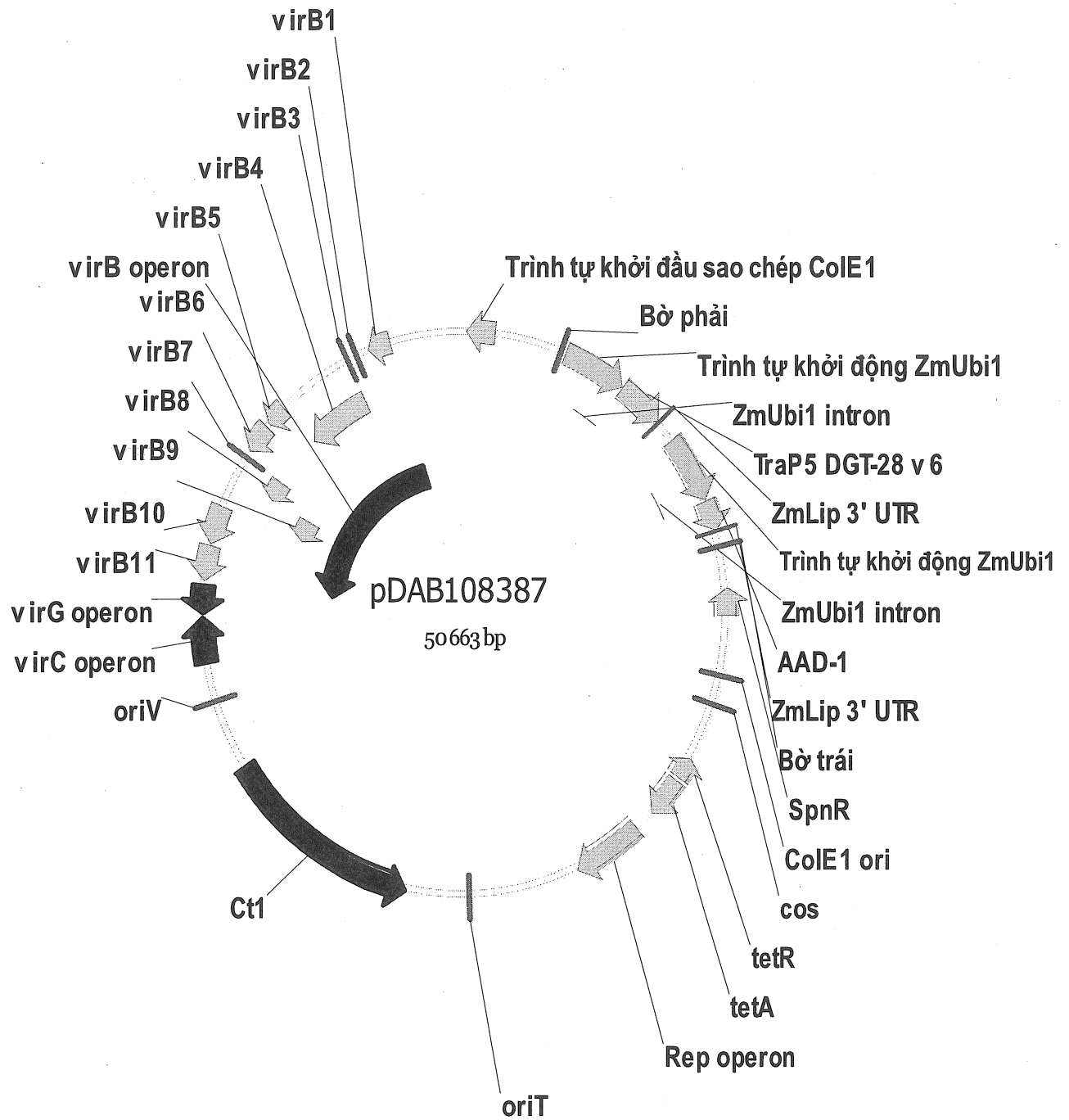


FIG. 44

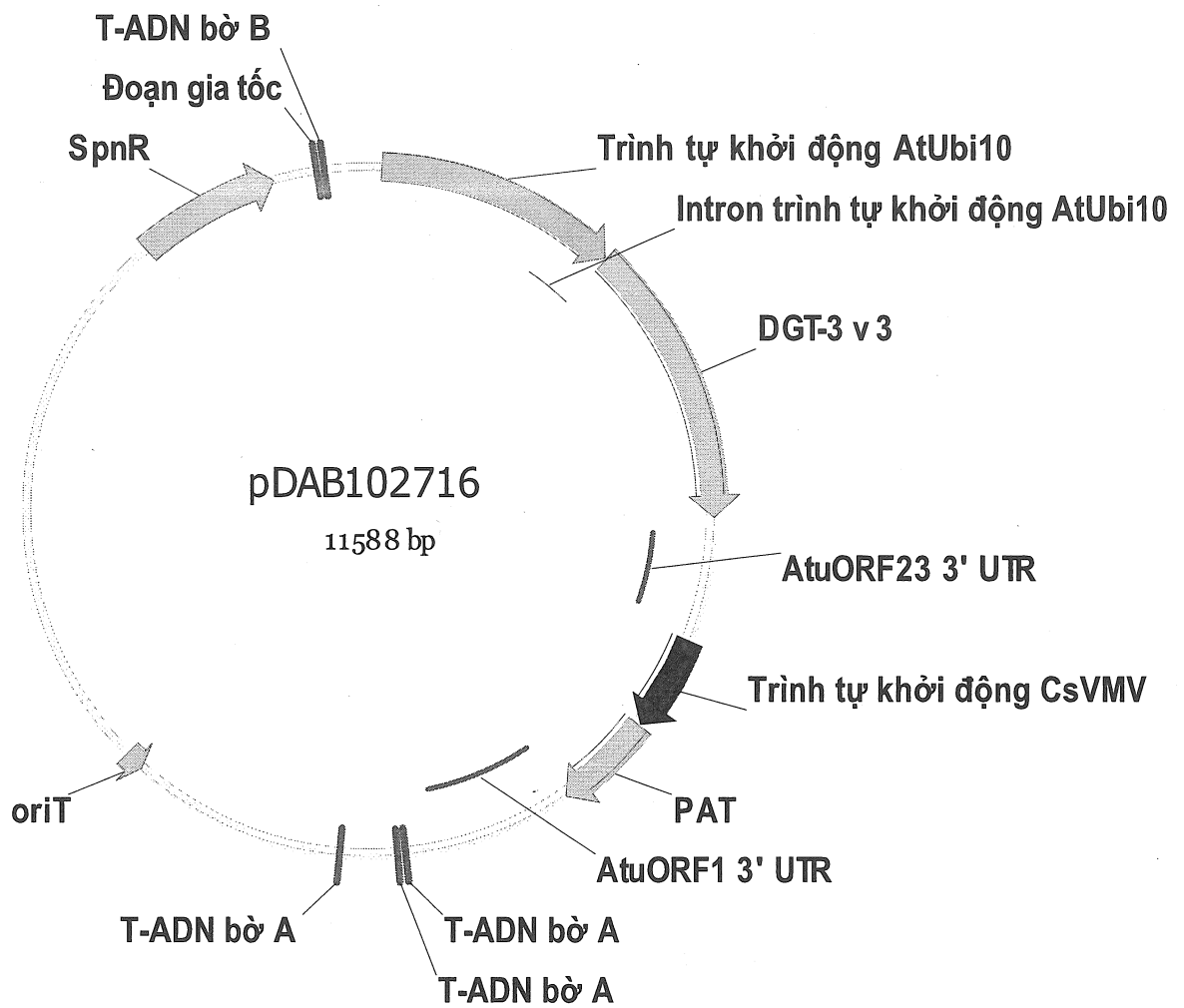


FIG. 45

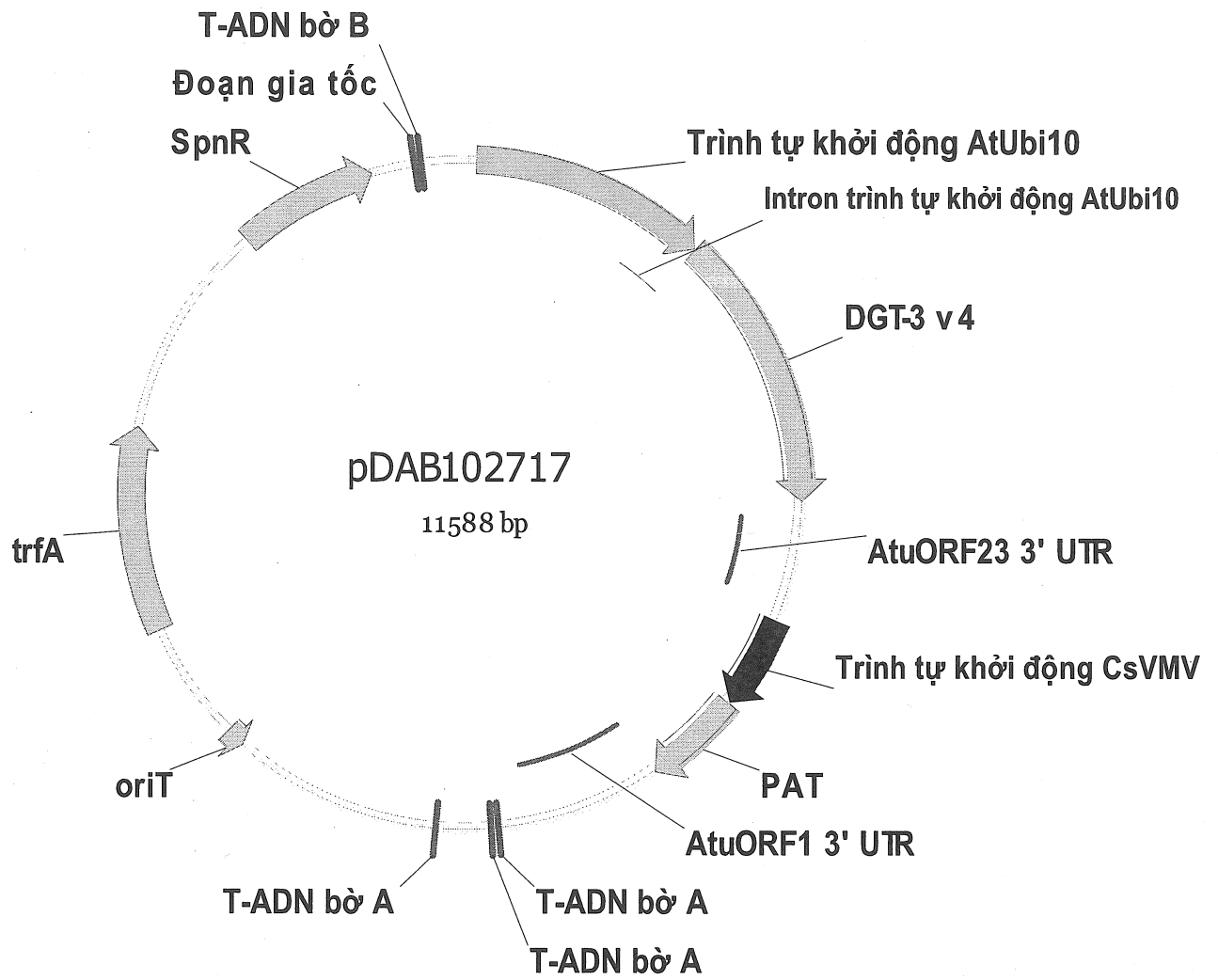


FIG. 46

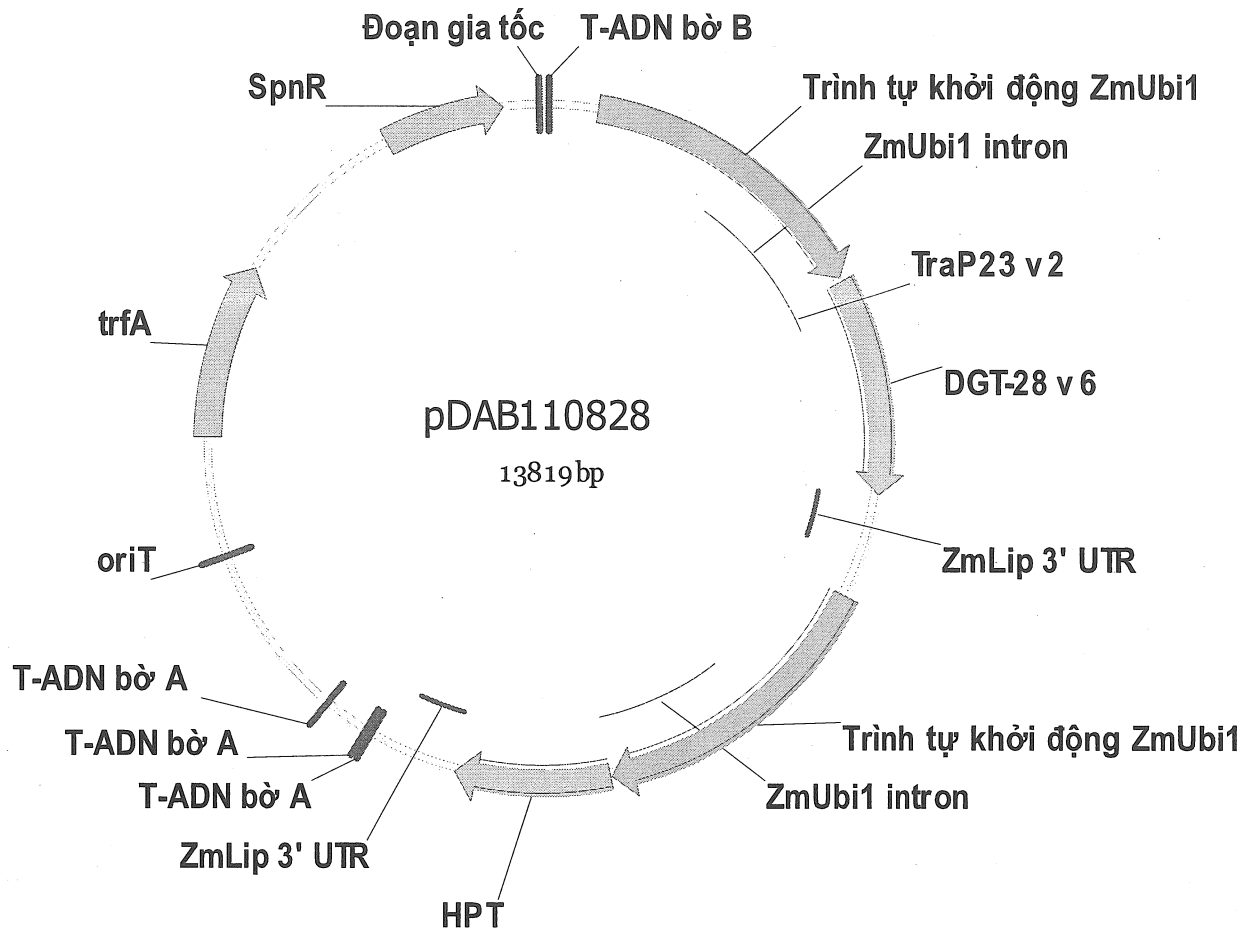


FIG. 47

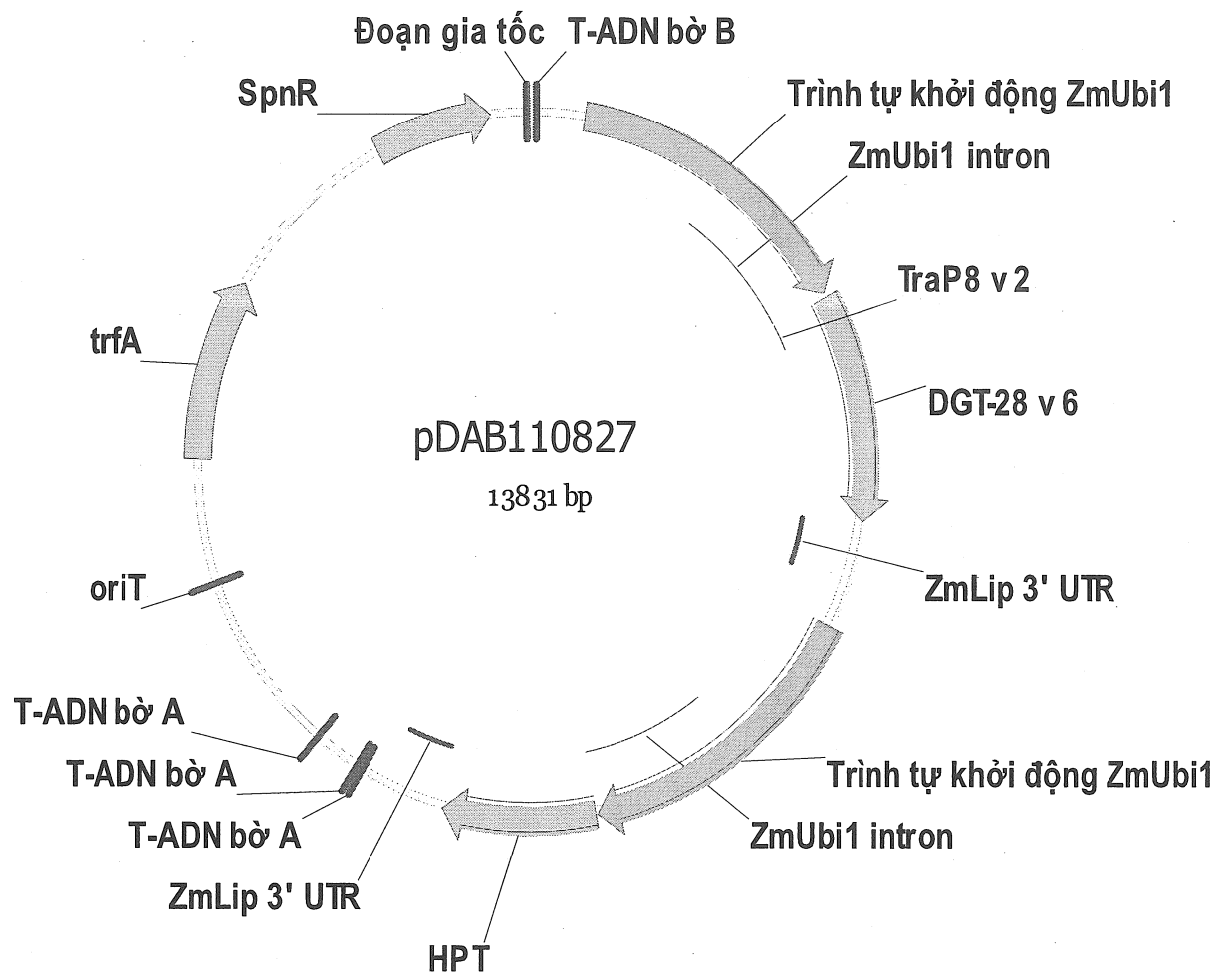


FIG. 48

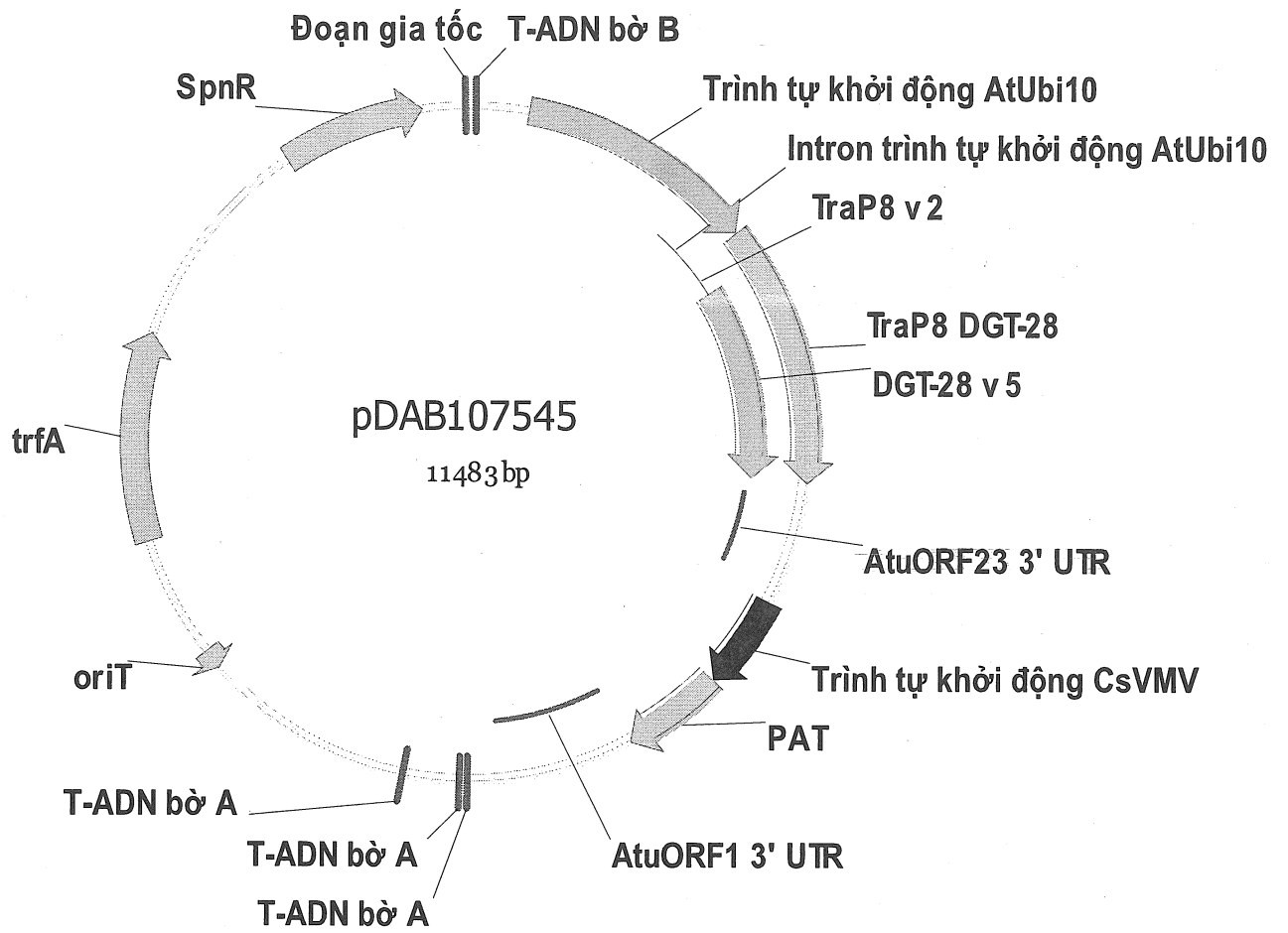


FIG. 49

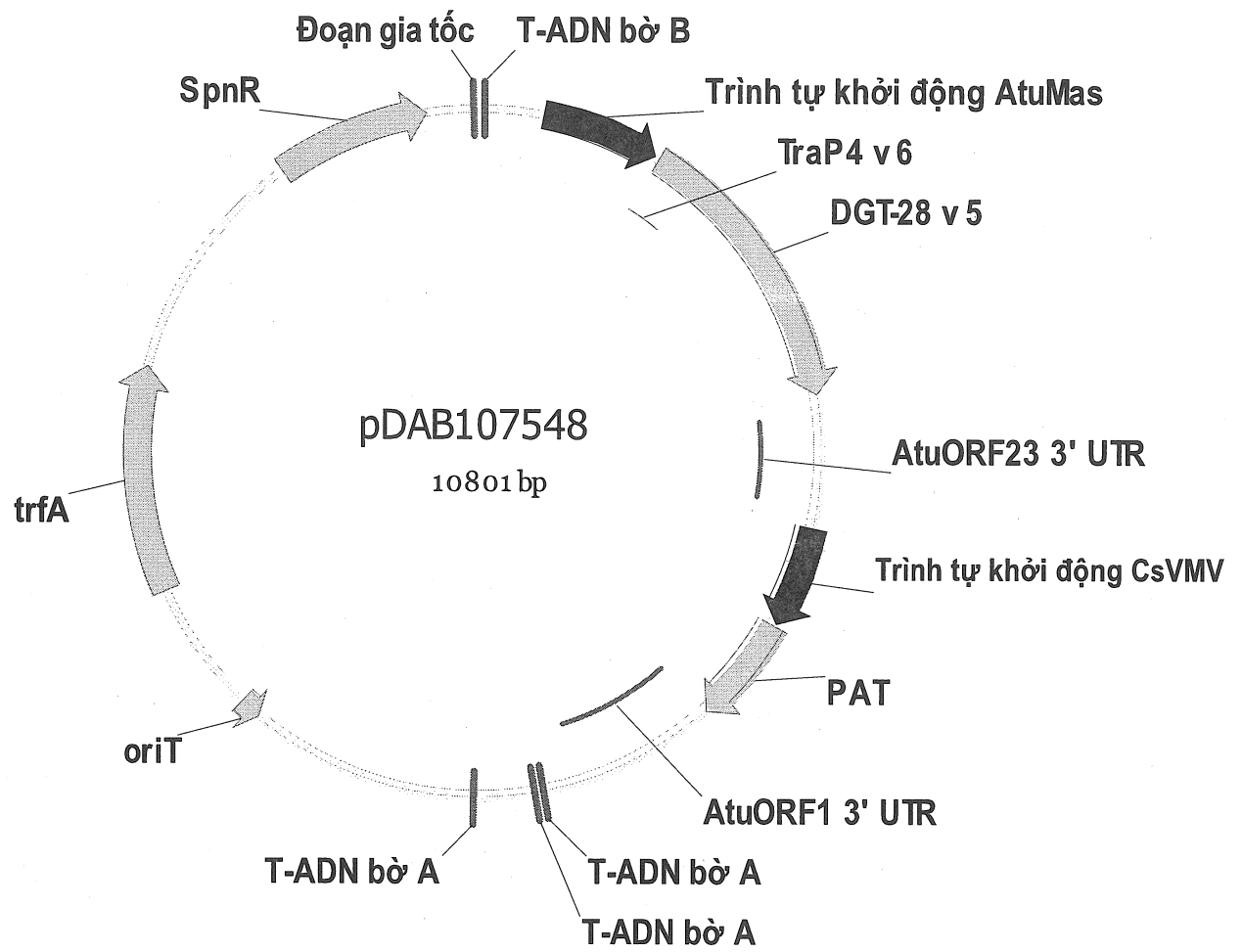


FIG. 50

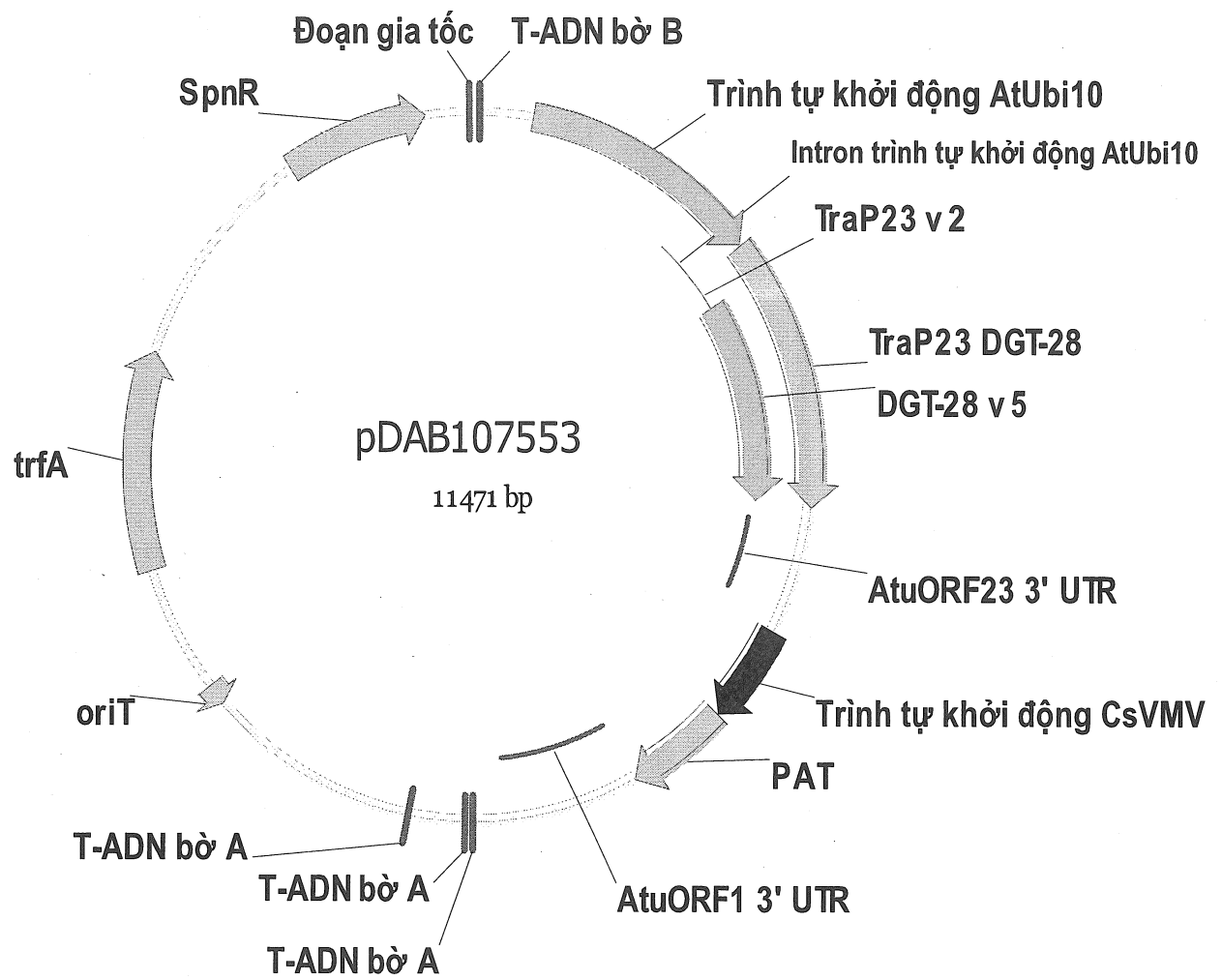


FIG. 51

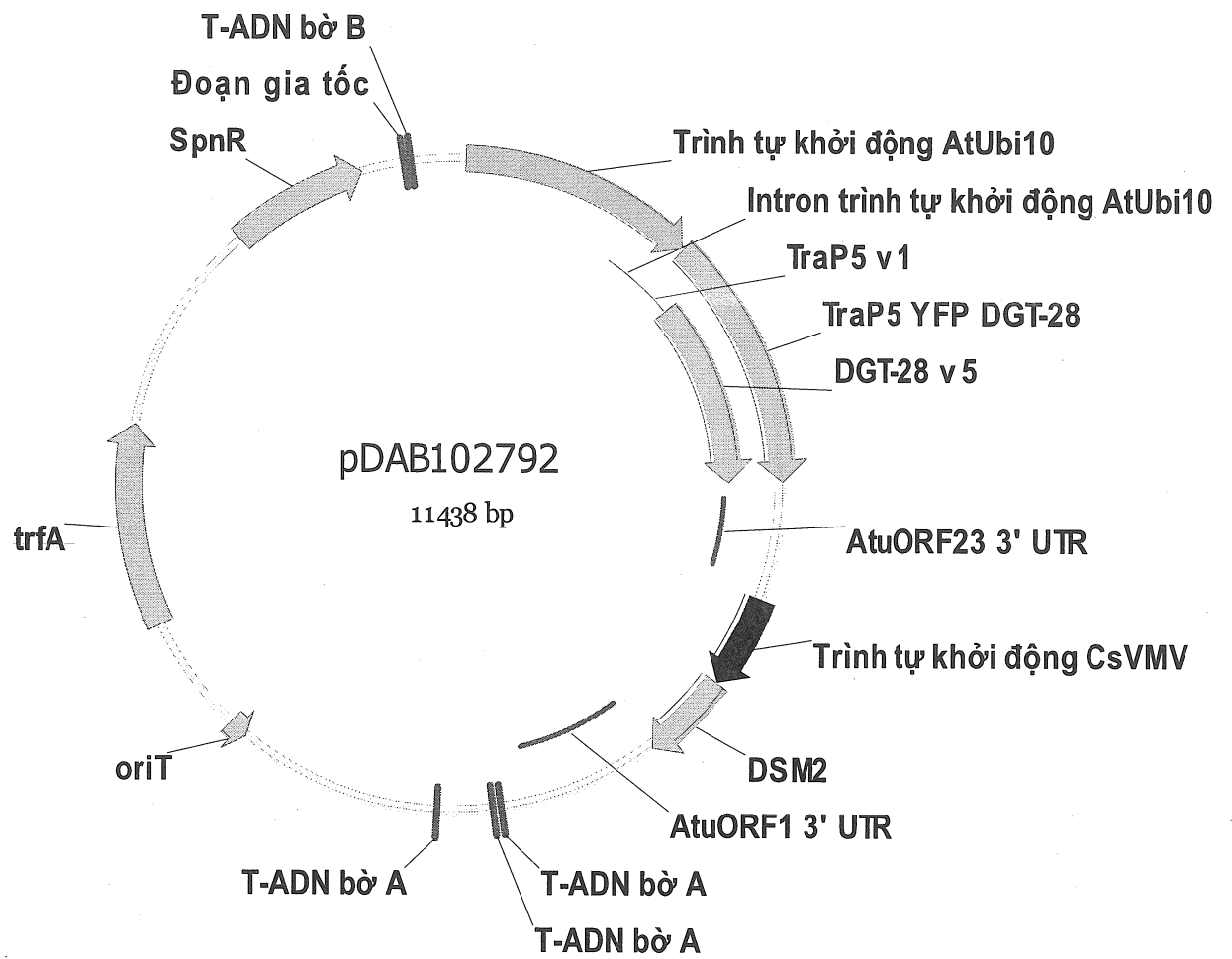


FIG. 52

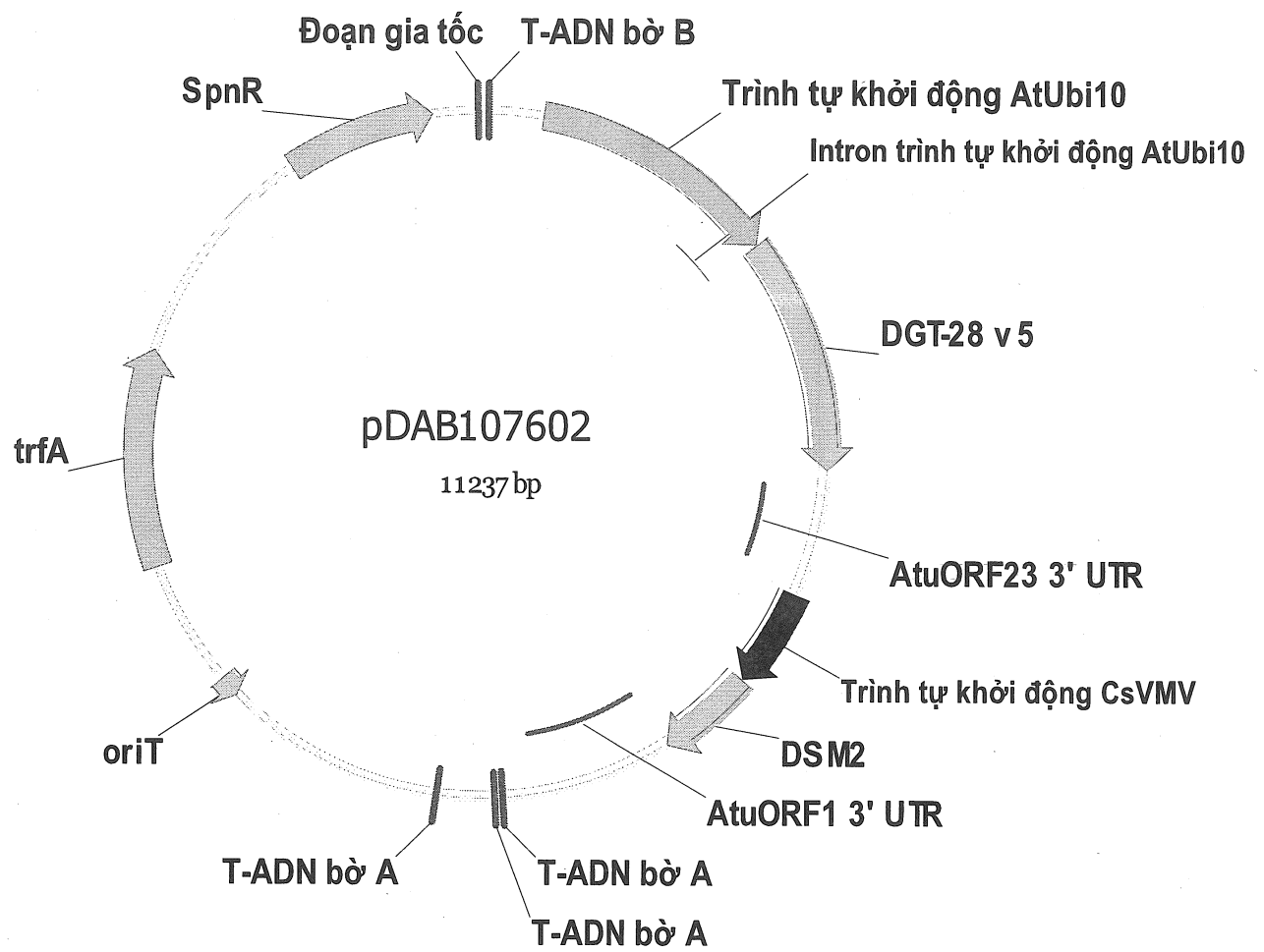


FIG. 53

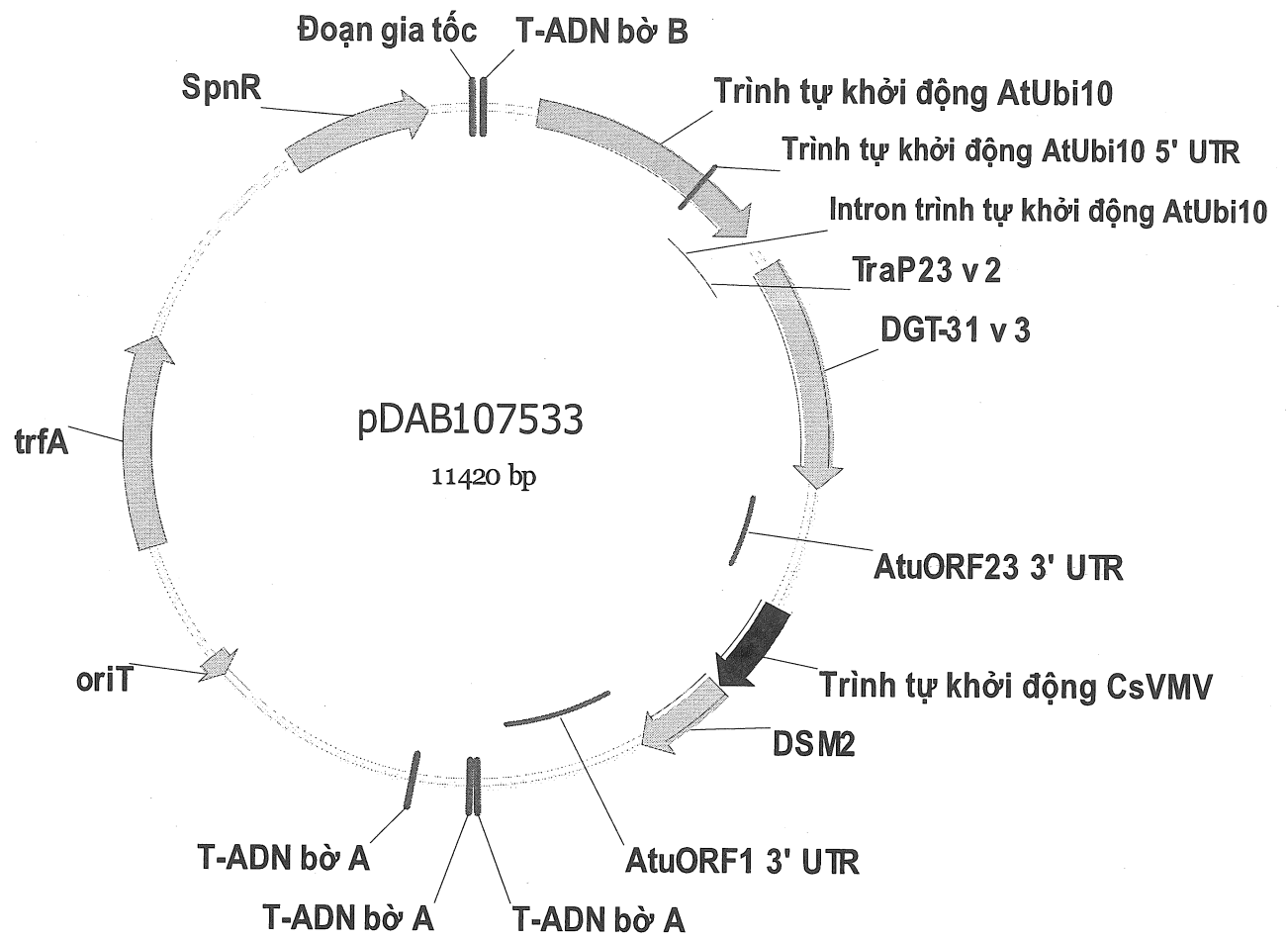


FIG. 54

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Dow Agrosiences
Lira, Justin
Cicchillo, Robert
Yerkes, Carla
Robinson, Andrew
- <120> Polynucleotit, vectơ, tế bào vật chủ, phương pháp tạo ra thực vật
kháng glycophosat và phương pháp phòng trừ cỏ dại
- <130> 2971-P10153.1US (68831)
- <160> 145
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 415
<212> PRT
<213> Streptomyces sviveus
- <400> 1

Met Arg Gly Met Pro Ala Leu Ser Leu Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr
1 5 10 15

Ala Arg Ala Leu Phe Leu Ala Ala Ala Asp Gly Val Thr Thr Leu
20 25 30

Val Arg Pro Leu Arg Ser Asp Asp Thr Glu Gly Phe Ala Glu Gly Leu
35 40 45

Val Arg Leu Gly Tyr Arg Val Gly Arg Thr Pro Asp Thr Trp Gln Val
50 55 60

Asp Gly Arg Pro Gln Gly Pro Ala Val Ala Glu Ala Asp Val Tyr Cys
65 70 75 80

Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro Thr Leu Ala Ala Ala
85 90 95

Gly His Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Pro Gln Met Arg Arg Arg
100 105 110

Pro Leu Leu Pro Leu Ser Arg Ala Leu Arg Asp Leu Gly Val Asp Leu
115 120 125

Arg His Glu Glu Ala Glu Gly His His Pro Leu Thr Val Arg Ala Ala
130 135 140

Gly Val Glu Gly Gly Glu Val Thr Leu Asp Ala Gly Gln Ser Ser Gln
145 150 155 160

Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Pro Leu Thr Arg Gln Gly Leu
 165 170 175

Arg Ile Arg Val Thr Asp Leu Val Ser Ala Pro Tyr Val Glu Ile Thr
 180 185 190

Leu Ala Met Met Arg Ala Phe Gly Val Glu Val Ala Arg Glu Gly Asp
 195 200 205

Val Phe Val Val Pro Pro Gly Gly Tyr Arg Ala Thr Thr Tyr Ala Ile
 210 215 220

Glu Pro Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Phe Ala Ala Ala Ala Leu
 225 230 235 240

Thr Pro Gly Ala Glu Val Thr Val Pro Gly Leu Gly Thr Gly Ala Leu
 245 250 255

Gln Gly Asp Leu Gly Phe Val Asp Val Leu Arg Arg Met Gly Ala Glu
 260 265 270

Val Ser Val Gly Ala Asp Ala Thr Thr Val Arg Gly Thr Gly Glu Leu
 275 280 285

Arg Gly Leu Thr Ala Asn Met Arg Asp Ile Ser Asp Thr Met Pro Thr
 290 295 300

Leu Ala Ala Ile Ala Pro Phe Ala Ser Ala Pro Val Arg Ile Glu Asp
 305 310 315 320

Val Ala Asn Thr Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Leu Glu Ala Cys Ala
 325 330 335

Glu Asn Leu Arg Arg Leu Gly Val Arg Val Ala Thr Gly Pro Asp Trp
 340 345 350

Ile Glu Ile His Pro Gly Pro Ala Thr Gly Ala Gln Val Thr Ser Tyr
 355 360 365

Gly Asp His Arg Ile Val Met Ser Phe Ala Val Thr Gly Leu Arg Val
 370 375 380

Pro Gly Ile Ser Phe Asp Asp Pro Gly Cys Val Arg Lys Thr Phe Pro
 385 390 395 400

Gly Phe His Glu Ala Phe Ala Glu Leu Arg Arg Gly Ile Gly Ser
 405 410 415

<210> 2
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces sviveus*

<400> 2
 atgagagggg tgccagcctt gtctttacct ggatcaaaga gtatcacagc tagggcactc 60
 tttcttgctg ctgctgctga tggggttact acttttgtga ggccattgag aagtgcagac 120
 acagaaggat tcgctgaggg gttagtctgt ttaggctatc gtgtaggag gacacccgat 180
 acttggcaag tcgatggcag accacaagga ccagcagtgg ctgaggctga cgtctactgt 240
 agagacggag caaccaccgc tagattcttg ccaaccttag cagctgctgg tcacggaaca 300
 tacagatttg atgcttcacc acagatgagg agacgtcctc ttttgccctt aagcagagcc 360
 ttgagggtatt tgggtgtcga tcttagacac gaagaagctg aaggtcatca ccctctgact 420
 gtccgtgctg ctgggggtga aggaggagag gttacttttg atgctgggtc gtcaagtcag 480
 tatctcactg ccttggtgct ccttggtccc cttacaagac aaggactgag gataaggggt 540
 actgatttgg tgtcagcacc atacgtggag attacgcttg caatgatgag ggctttcgga 600
 gttgaagtgg caagggaggg agatgtgttc gttgttccac ctggtggata tcgtgcaact 660
 acgtatgcta tagaaccga cgcaagtact gcttcttact tcttcgcagc tgctgctttg 720
 actcctggag ctgaagtgc tgtacctggg ttaggcacgg gagcacttca aggagatttg 780
 ggattttag atgtcttaag gagaatggga gccgaggtgt ccgtaggagc tgatgcaacc 840
 actgttagag gaactggtga attgcgtggc cttacagcca acatgagaga cataagtgat 900
 acgatgccga ccctcgctgc aatagcacc tttgctagt ctccagttag aatcgaggat 960
 gttgccaaca ctctgtgcaa agaattgtgc agacttgagg cttgtgcaga gaaccttagg 1020
 aggttgggag taagggttgc aacgggtccg gactggattg agatacacc tgggtccagct 1080
 actggtgctc aagtcacaag ctatggtgat cacagaattg tgatgtcatt tgcagtgact 1140
 ggacttcgtg tgcttgggat cagcttcgac gaccctggct gtgttcgtaa gacttttctc 1200
 gggtttcacg aggctttcgc agaattgagg cgtggcattg ggagctga 1248

<210> 3
 <211> 1251
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces sviveus*

<400> 3
 atggcaagag ggatgccagc cttgtcgctg cctgggtcaa agtcgatcac ggctagagca 60
 ctctttctcg cagcagcagc cgacggagtc accacgcttg tgagaccgct gcggtcagac 120
 gacaccgagg gttttgcgga aggcctcgtc agactgggct atcgggttgg gaggactccc 180

gacacgtggc aagtggacgg aaggccacaa ggtccagcag ttgccgaggc tgatgtgtat 240
 thtagagacg gtgcaacaac ggctaggttc ctccccacac tcgcagctgc tggacacggg 300
 acctacagat ttgatgcctc tccccagatg aggagaaggc cactgctgcc tctttctagg 360
 gctttgaggg accttggcgt tgatcttcgc cagaggaag cggaagggca ccacccttg 420
 accgtgagag ctgctggagt cgagggaggt gaggttacac tcgatgctgg acagtcctct 480
 cagtacttga cggcactgct gctgctcggc ccgctcacac gccaaagggt gcggattcgc 540
 gtcactgatc tggttagcgc tccgtacgtg gagattacac ttgcgatgat gagagctttt 600
 ggggtcgagg ttgcacgcga aggcgacgtt ttcgtggtgc ctcttggtgg ctacagagcg 660
 actacgtacg cgattgagcc agatgccagc accgcaagct acttctttgc agctgctgcg 720
 ttgacacctg gagccgaggt cacagtgcct ggactcggga ccggagcgct tcaaggggat 780
 ctcggttcg tggacgtgct gcggaggatg ggtgccgagg tcagcgtggg agcagacgct 840
 acgactgtta gaggcacggg tgagcttaga ggccttacag caaacatgag ggacatatcc 900
 gacacgatgc cgacgcttgc tgccatcgct ccgttcgctt cagcacccgt cagaattgaa 960
 gatgtggcga aactcgcgt caaagagtgc gacagacttg aagcgtgtgc cgagaacttg 1020
 aggaggttgg gagtgagagt cgcaactggt ccagactgga tcgagatcca ccctggtcca 1080
 gctactggag cgcaagtcac aagctatggc gaccatagga ttgttatgtc attcgcagtg 1140
 accggactca gattccttg gatctctttc gacgacctg gttgcgtgcg gaaaacgttc 1200
 cctggcttcc acgaggcatt tgcggagctg cgagaggaa ttggttctg a 1251

<210> 4

<211> 1248

<212> ADN

<213> *Streptomyces sviveus*

<400> 4

atgcgtggta tgctgcact gagcctgcct ggtagcaaaa gcattaccgc acgtgcactg 60
 tttctggctg cagcagcaga tgggtgtacc accctggttc gtcctctgcg ttctgatgat 120
 accgaaggtt ttgcagaagg tctggttcgt ctgggttata gtgttggtcg tacaccggat 180
 acctggcaag ttgatggtcg tccgcagggt ccggcagttg ccgaagcaga tgtttattgc 240
 cgtgatggtg caaccaccgc acgttttctg ccgacctgg cagcagccgg tcatggcacc 300
 tatcgttttg atgcatctcc gcagatgcgt cgtcgtccgc tgctgccgct gtctcgtgca 360
 ctgctgatc tgggtgttga tctgcgtcat gaagaagcag aaggtcatca tccgctgacc 420
 gttcgtgcag ccggtgttga aggtggtgaa gtgacctgg atgccggtca gagcagccag 480
 tatctgaccg cactgctgct gctgggtccg ctgacacgtc aggttctgcg tattcgtgtt 540
 accgatctgg ttagcgcacc gtatgtggaa attaccctgg caatgatgcg tgcatttgg 600

gttgaagttg cacgtgaagg tgatgttttt gttgttccgc ctggtggtta tcgcgcaacc 660
 acctatgcaa ttgaaccgga tgcaagcacc gcaagctatt tttttgcagc agcagccctg 720
 acaccgggtg cagaagttac cgttcctggt ctggggcacag gtgcaactgca gggatgatctg 780
 ggatttggtg atgttctgcg tcgtatgggt gccgaagtta gcgttggtgc agatgccacc 840
 accgttcgtg gtacaggtga actgcgtggt ctgaccgcaa atatgcgtga tattagcgat 900
 accatgccga cactggctgc aattgcaccg tttgcaagcg caccgggttcg tattgaagat 960
 gttgcccaaca cccgtgttaa agaattgtgat cgtctggaag catgtgcaga aaatctgcgt 1020
 cgtctgggcg ttcgtgttgc aaccgggtccg gattggattg aaattcatcc ggggtccggca 1080
 accgggtgcac aggttaccag ctatggtgat catcgatcg ttatgagctt tgcagttacc 1140
 ggtctgcgtg ttccgggtat tagctttgat gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg 1200
 ggttttcatg aagcttttgc agaactgcgt cgtggtattg gtagctaa 1248

<210> 5
 <211> 1599
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<400> 5
 atggctcaag tctcccgtgt tcacaatctt gctcagtcaa cccaaatctt tggacattca 60
 agcaactcaa acaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttgccccacg cctttgggga 120
 gcatccaaga gtgcataacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cttcaatggt 180
 gggaaaggca attctggtgt cttcaaagtt tcagcttctg ttgcagccgc agagaaaccc 240
 agcacttccc ctgagattgt tcttgaaccc attaaggact tcagtggaac aatcactctg 300
 cctggatcaa agagtctttc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaagggaacc 360
 actgtagttg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acatgttggg tgctctcaga 420
 actcttgggt tgagagttga agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt 480
 ggtgggttgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttggt tcttggcaat 540
 gctggaattg caatgagaag cctcactgct gcagtagttg cagctggtgg gaatgcaagt 600
 tatgtccttg atggtgtccc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct tgtggctggc 660
 ctgaaacagc ttggagcaga tgttgattgc ttcttgggca caaactgccc tccagtgaga 720
 gtgaatggga agggaggttt gcctggtgga aaggtcaaac tgagtggatc agtctcttcc 780
 cagtatctga ctgccttgct catggctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagattgaa 840
 atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaaatga ccctcaaact catggagagg 900
 tttggagttt ctgttgaaca ttctggcaac tgggatcggt tccttgtaaa tggaggtcag 960
 aagtacaaaa gccctggcaa tgcctttggt gaaggggatg caagctctgc ttctatctc 1020

ttggctgggg	ctgccatcac	tggtgggacc	atcactgtga	atggctgtgg	cacctcatcc	1080
cttcaagggtg	atgtaaagtt	tgagagaggtc	ttggagaaaa	tggttgccaa	ggcacctgg	1140
tctgagaaca	gtgtaactgt	gtctggacct	cccagagact	tcagtggcag	aaaggttctc	1200
cgtggaattg	atgtgaacat	gaacaagatg	ccagatgtgg	ccatgaccct	cgctgttgta	1260
gccctgtttg	caaatggacc	aactgcaatc	cgtgatgttg	cttcatggag	ggggaaggag	1320
acagagagga	tgattgccat	ttgcacagaa	ctccgcaaac	ttggtgcaac	agttgaagag	1380
ggaccagatt	actgtgtgat	aacccacact	gagaagctca	atgtgacagc	cattgacacc	1440
tatgatgacc	acagaatggc	aatggctttc	tcccttgctg	cctgtggtga	tgtgcctgtg	1500
actatcaaag	accctgggtg	cacaaggaag	acatttccag	actactttga	agttttggag	1560
aggttgacaa	agcactgagt	agttagctta	atcacctag			1599

<210> 6
 <211> 1551
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

<400> 6	
atggctcaat	cttcaaggat
ttgccacggt	gttcagaacc
cttgtgtgat	catatccaat
	60
ctcagtaaga	gcaatcagaa
caaatcacc	ttctctgtct
ccctcaaaac	tcatcaacca
	120
cgtgcatcta	gttggggatt
gaagaaaagt	gggacaatgc
tgaacggatc	agtcattagg
	180
cctgtaaagg	ttacagcctc
tgtgtccacg	agtgaagg
caagcgagat	cgtcttacia
	240
ccgattagag	aaatctctgg
gcttatcaag	ttgcctggct
ccaaatcact	ctccaatagg
	300
atacttcttt	tggtgcact
gagtgaaggc	acaactgttg
tggacaactt	gctcaactcc
	360
gatgatatca	actacatgct
tgacgccttg	aagaagttag
gactcaatgt	ggagagagat
	420
agcgtaaca	atcgtgctgt
cgtagaagga	tgtggtggca
tctttcctgc	atctctggat
	480
tctaagagcg	acatcgagct
ttacttgggc	aatgctgcaa
cagccatgag	accgttaact
	540
gctgctgtta	ccgcagctgg
aggaaatgct	agttatgtgc
ttgatggtgt	tccaagaatg
	600
agggaaaggc	caatagggga
tttggctcgtc	ggactgaaac
agctcgggtgc	tgacgttgaa
	660
tgtacttttag	gcacaaactg
tcctcccgtg	cgtgttaacg
caaatgggtg	actgcctggt
	720
ggaaagggtca	agttgtctgg
ctccatttcc	agtcaatacc
ttacggcttt	gctcatggct
	780
gcaccacttg	ccttaggtga
tgtggagatt	gagatcattg
acaagctcat	atctgttccg
	840
tacgtggaaa	tgacacttaa
gctgatggaa	agattcggag
tttcagccga	acattccgat
	900
agctgggatc	gtttctttgt
aaaggtggg	cagaagtaca
agtctcctgg	caatgcttat
	960
gtggaagggtg	acgcttcttc
agctagttac	ttcttggtg
gtgcagccat	aactggcgag
	1020
acagttaccg	tggaaggatg
cggaactacc	agcctccaag
gtgatgtcaa	gttcgcagag
	1080

gtgttggaag agatggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
 cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag 1200
 atgccagatg tcgctatgac ttttagcagtt gtggcactgt ttgccgatgg tcctacaacg 1260
 attagggacg tagcttcttg gagagtcaaa gaaactgaga ggatgatcgc catttgtact 1320
 gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaaggggtccg attactgctg gattactcct 1380
 ccagctaaag ttaagcctgc tgagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc 1440
 tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
 aagacatttc ccgactactt tcaagtgcct gagtcaatca cgaaacactg a 1551

<210> 7

<211> 1551

<212> ADN

<213> Brassica napus

<400> 7

atgggtcaat cttcaaggat ttgccacggg gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat 60
 ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcacc ttctctgtct ccctcaaaac tcatcaacca 120
 cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagc ggaacaatgc tgaacggatc agtcattagg 180
 cctgtaaagg ttactgcatc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttataa 240
 ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaactact ctccaatagg 300
 atacttcttt tggctgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc 360
 gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat 420
 agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtgggtgaa tctttcctgc atctctggat 480
 tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctgcaa cagccatgag atccttaact 540
 gctgctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatgggtg tccaagaatg 600
 agggaaaggc caatagggga tttggctcgc ggactcaaac agctcgggtg tgacgttgaa 660
 tgtactttag gcacaaactg tcctcccggt cgtgttaacg caaatgggtg actgcctggt 720
 ggaaaagtca agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct 780
 gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg 840
 tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat 900
 agctgggatc gtttctttgt aaaggaggag cagaagtaca agtctcctgg aaacgcatac 960
 gtggaagggt acgcttcttc agctagttac ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag 1020
 acagttaccg tggaaggatg cggaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gttcgcagag 1080
 gtgttggaag agatggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
 cctagtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagagccg ttgacgtgaa catgaacaag 1200

atgccagatg tgcctatgac cttagctgtg gttgcactgt ttgccgatgg tcctacaacg 1260
 attagggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc cttttgtact 1320
 gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaaggggtccg attactgctg gattactcct 1380
 ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggct 1440
 ttcagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
 aagacatttc ccgactactt tcaagtgtt gagtcaatca cgaaacactg a 1551

<210> 8

<211> 1551

<212> ADN

<213> Brassica napus

<400> 8

atgggtcaat cttcaaggat ttgccacggt gttcagaacc cttgtgtgat catatccaat 60
 ctcaagtaaga gcaatcagaa caaatcacc ttctctgtct ccctgaaaac tcatcaacca 120
 cgtgcatcta gttggggatt gaagaaaagt ggcacaatgc tgaacggatc agtcattagg 180
 cctgtaaagg ttacagcctc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacia 240
 ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcctggct ccaaactact ctccaatagg 300
 atacttcttt tggctgcact gagtgaaggg acaactgttg tggacaactt gctcaactcc 360
 gatgatatca actacatgct tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat 420
 agcgttaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgtgggtggaa tctttcctgc atctctggat 480
 tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgctggca tcgccatgag atccttaact 540
 gctgctgtta ccgcagctgg tggaatgct agttatgtgc ttgatgggtg tccaagaatg 600
 agggaaaggc caatagggga tttggttgtc ggactcaaac agctcgggtc tgacgttgaa 660
 tgtacttttag gcacaaactg tcctcccgtg cgtgttaacg caaatgggtg actgcctgg 720
 ggaaagggtc agttgtcttg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct 780
 gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagatcattg acaagctcat atctgttccg 840
 tacgtggaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag tttcagccga acattccgat 900
 agctgggatc gtttcttcgt aaaggagggg cagaagtaca agtctcctgg gaacgcatac 960
 gtggaagggtg acgcttcttc agctagttac ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag 1020
 acagttaccg tggaaggatg cggaactacc agccttcaag gtgatgtcaa gttcgcagag 1080
 gtgttggaag agatgggggtg caaagtttcc tggacagaga actcagttac tgtaacggga 1140
 cctagtaggg atgcttttgg aatgagacac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag 1200
 atgccagatg tgcctatgac tttagctgta gtggcactgt tcgcagatgg tcctacaacg 1260
 ataaggacg tagcctcttg gagagtcaaa gaaaccgaga ggatgatcgc cttttgtact 1320

gagcttcgta agttgggtgc cacagttgaa gaaggggtccg attactgcgt gattactcct 1380
ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgatg accacagaat ggctatggcc 1440
tttagcctcg ctgcatgtgc cgatgttcca gtcacgatca aggaccctgg ctgtactaga 1500
aagacatttc ccgactactt tcaagtgcctt gagtcaatca cgaaacactg a 1551

<210> 9

<211> 1533

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<400> 9

atggcaatgg ctgctgctgc tactatggct gcaagcgctt cctcttccgc tgtgagctta 60
gacagagcag ctccagcacc atctaggcgt ctgccaatgc cagcagctag accagctagg 120
agaggtgcag tccgtttgtg gggaccaagg ggagcagctg cacgtgctac aagtgtcgca 180
gcaccagcag caccgagtgg agctgaggaa gtcgtgcttc aacctatcag agagatcagc 240
ggtgccgtcc agctccctgg gtcaaagtca cttagcaaca gaatacttct tttgagcgca 300
ttgtcagagg gcacgacagt ggtggataac cttctgaact ctgaagatgt tcactacatg 360
cttgaggctt tggaggcatt aggtctttct gttgaagccg ataagggtgc taagcgtgct 420
gtggtggttg gttgcggagg gagattccca gttgagaaag atgctcaaga ggaagttaag 480
ctgtttctgg gaaatgctgg gattgcaatg aggagcttga ctgctgctgt ggttgctgct 540
ggtggaaatg ccacatacgt ccttgatgga gtgcctagaa tgagagagag accgattggg 600
gatctgggtg ttggccttca gcaacttga gacagcgtg actgctttct tggaacaaac 660
tgtccacccg ttaggatcaa cgggaaagga ggtctccctg gtgggaaggt taagttgtct 720
ggatcaatct ctagtcagta tctgtcatca cttctcatgg ctgcacctct tgcacttgaa 780
gatgttgaga ttgaaatcat agacaaactc atatcagttc catacgtgga aatgacgctg 840
aagctgatgg agaggttcgg agtgacagca gagcactcag attcttggga taggttctac 900
atcaagggag gtcagaagta caaatcacct gggaacgctt acgtggaagg tgatgcctct 960
tctgcttcct acttcctcgc tggagcagca atcaccggag gaactgttac tgtcgaaggt 1020
tgcggaacta cttccttgca aggggacgtc aagttcgcag aagtcttaga aatgatggga 1080
gctaaagtta cttggaccga tacaagtgtt acagtgactg gtccctccacg tcaacccttt 1140
ggaaggaagc acctcaaagc cgttgatgtt aacatgaaca agatgccaga tgtcgccatg 1200
acgcttgccg ttgtggctct gttcgagat ggtccacag ccattagaga cgtggccagc 1260
tggaggggtga aagaaactga aaggatggc gccattagaa cagagttaac caaacttgga 1320
gctactgtgg aagagggacc cgactattgc atcattacac ctcccgagaa gctgaacata 1380
accgctattg acacttatga tgatcatcgt atggctatgg ctttttcatt agcagcttgc 1440

gctgaggtgc cagtaacat tagagatcct ggggtgtacta ggaaaacttt ccctaactac 1500
 ttcgatgtcc tttcaacatt cgtgaagaat tga 1533

<210> 10
 <211> 1281
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces roseosporus*

<400> 10
 atgacggtga tagagatacc tgggtctaag tctgttacag ccagagcact gttcttggca 60
 gctgctgccg atgggacgac tactcttctt agaccattgc gtagcgatga cactgagggc 120
 ttgcgagaag gactgaggaa tctgggctat gctgtggaac aagaggctga taggtggcgt 180
 gtccaaggca gaccagctgg accagcagcc acggaagcag atgtctattg cagagatggt 240
 gccaccaccg ctaggttctt tccgacactg gcagcagcag ctgcttccgg aacctacaga 300
 ttcgacgctt cagcacagat gcgtcgctgt ccccttgctc cattgacaag ggcacttaca 360
 gccttgggtg tggatcttag acacgaagga gcagacggac atcatccgct caccgttcgt 420
 gcagctggca tcgaaggagg agaattgacg ctcgacgctg gcgagtcag ccaatacttg 480
 acagcactgc tcatgctcgg acctcttaca acaaaggac ttgcgcatga agttacagaa 540
 ctgctctctg caccctacgt ggaaatcacc ctgctatga tgagagactt tgggtgtggag 600
 gttgagaggg aggggaatac cttcaccgtt ccaagcccat cttcaagact taggtccaat 660
 agaggtggac ccataggagg ctatagagct actacgtatg ctgtcgagcc agatgcctca 720
 actgcctctt acttctttgc agctgctgcc ctactggctc gcgaggtcac agtgcctgga 780
 ttggggactg gagctttgca aggtgatttg cgtttcgtgg atgtgctgag agaaatgggt 840
 gccgaggtgt ctgttggtcc ggacgccaca actgtgctgt caactggcag attgagggga 900
 atcactgtga acatgagaga tatctcagac acgatgccta cactcgagc tattgcacct 960
 tatgccgatg gtccagtggg gattgaagat gttgccaaca cccgtgtgaa ggagtgtgac 1020
 cgtctggagg cttgtgctga gaatctgagg gcaatgggaa tcaccgtcca tacgggtccg 1080
 gataggatag aaatccatcc tggaacacct aaaccgactg ggatcgccac ccacggagat 1140
 caccgcatag tcatgtcatt tgccgtcgct ggccttcgca ctctggcct cacttacgac 1200
 gaccctggct gcgtgcgtaa gaccttcct agatttcacg aggtgtttgc cgacttcgct 1260
 cacgaccttg aggggaagtg a 1281

<210> 11
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces griseus*

<400> 11
 atgggtgcag tgacagtcac cgacattcct ggaagcaaga gcgtgacagc aagggcactc 60

ttctttggcag cagcagccga tggaacgaca aactgtcttc gtcctctgag gtcagacgac	120
acggagggggt ttgccgaggg tcttaagaat ctcggttatg ccgttgagca agaggctgac	180
cgttggaggg tcgaaggcag accggatggg ccagctgctc cggatgcaga tgtctactgc	240
cgtgatgggtg caacgactgc acgctttctt ccaaccctcg tcgcagcagc agcttctgga	300
acgtatcggtt tcgacgcctc agcacagatg aggagacgtc ccttggctcc actcactagg	360
gcactgacag ctcttggcgt ggatttgaga catgggtggag aggaggggtca tcatccactg	420
actgtcagag ctgctggcat agaaggtggc gatgttgctc ttgacgctgg tgaatcttct	480
cagtatctca cagcccttct tatgttgggt ccgttgactg ccaaaggtct tagaatcgaa	540
gtcactgatac tcgtgagcgc tccttacgtt gaaatcactc tggccatgat gagagatttc	600
ggagttgatg ttagcagaga aggaaacact ttcaccgtgc cgtccggagg ctatagagct	660
acagcctacg ctgtggagcc agacgcaagc acggcttctt acttctttgc agcagctgcc	720
ctcactggac gcgaggtgac ggtccctggg ctgggaattg gtgctcttca aggagacctt	780
cgttttgtgg acgtgctgcg tgatatggga gcagaggtgt ctgttgacc agatgccacg	840
acagtgcgct caactggcag actccgtggc attacagtta ctatgagaga catttcagac	900
acgatgccaa cactcgctgc tattgcacct cacgctgatg gaccctccg tattgaggac	960
gtggcaaaca ctcggtgcaa ggaatgtgat aggcttgagg catgtgctca aaaccttaga	1020
gctatgggaa tcacgggtgca tactgggcac gattggattg agattctccc tgggactcca	1080
aagccaacgg gaatagctac gcacggagat cacagaatcg ttatgtcctt cgcagtggct	1140
ggtttgttga cccctgggct gacatacgat gatcctggct gcgtccgcaa gacttttcca	1200
aggttccacg aagttttcgc tgactttgct gcatcacccc aagcctga	1248

<210> 12
 <211> 1368
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<400> 12	
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg	60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt	120
ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttggtg ataactctgct gtatagcgaa	180
gatattcatt atatgctggg tgcaactgct accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa	240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc	300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcaggcaccc caatgcgtcc gctgaccgca	360
gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt	420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tggtgattgt	480

```

tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtgggtct gccgggtggt      540
aaagttaaac tgagcggtag cgtagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct      600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat      660
gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttgggtgta gcgttgaaca tagcggtaat      720
tgggatcggt ttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttggt      780
gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtggtaca      840
attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcaggcg atgttaaatt tgccgaagtg      900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcgggtccg      960
ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg     1020
ccggatgttg ccatgaccct ggcagttggt gccctgtttg caaatgggtcc gaccgcaatt     1080
cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa     1140
ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg     1200
gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgatggc aatggcattt     1260
agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa     1320
acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa     1368

```

```

<210> 13
<211> 1368
<212> ADN
<213> Glycine max

```

```

<400> 13
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg      60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt     120
ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttggtg ataactctgct gtatagcgaa     180
gatattcatt atatgctggg tgcaactgct accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa     240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc     300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcagcaaccg caatgcgtcc gctgaccgca     360
gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt     420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt     480
tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtgggtct gccgggtggt     540
aaagttaaac tgagcggtag cgtagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct     600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat     660
gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttgggtgta gcgttgaaca tagcggtaat     720
tgggatcggt ttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttggt     780

```

gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca 840
attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg 900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcgggtccg 960
ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg 1020
ccggatgttg ccatgaccct ggcagttggt gccctgtttg caaatgggtcc gaccgcaatt 1080
cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa 1140
ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg 1200
gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt 1260
agcctggcag catgtggtga tgttcgggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa 1320
acctttccag attattttga agttctggaa cgctgacca aacattaa 1368

<210> 14
<211> 1368
<212> ADN
<213> Glycine max

<400> 14
atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg 60
attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt 120
ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttggtg ataactctgct gtatagcgaa 180
gatattcatt atatgctggg tgcaactgct accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa 240
accaccaaac aggccattgt tgaaggttgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc 300
aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcagcaaccg caatgcgtag cctgaccgca 360
gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt 420
gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggc ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt 480
tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aaggtggtct gccgggtggt 540
aaagttaaac tgagcggtag cgtagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct 600
ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat 660
gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat 720
tgggatcggt ttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtta tgcctttggt 780
gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca 840
attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg 900
ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcgggtccg 960
ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg 1020
ccggatgttg ccatgaccct ggcagttggt gccctgtttg caaatgggtcc gaccgcaatt 1080

cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa 1140
 ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg 1200
 gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt 1260
 agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa 1320
 acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa 1368

<210> 15
 <211> 1368
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<400> 15
 atggcaagcg ttgcagcagc agaaaaaccg agcacctctc cggaaattgt tctggaaccg 60
 attaaagatt ttagcggcac cattaccctg cctggtagca aaagcctgag caatcgtatt 120
 ctgctgctgg cagcactgag cgaaggcacc accgttgttg ataactctgct gtatagcgaa 180
 gatattcatt atatgctggg tgcactgctg accctgggtc tgcgtgttga agatgataaa 240
 accaccaaac aggccattgt tgaagggtgt ggtggtctgt ttccgaccag caaagaaagc 300
 aaagatgaaa ttaacctgtt tctgggtaat gcaggcatcg caatgcgtag cctgaccgca 360
 gcagttgttg cagccggtgg taatgcaagc tatgttctgg atggtgttcc gcgtatgcgt 420
 gaacgtccga ttggtgatct ggttgccggt ctgaaacagc tgggtgcaga tgttgattgt 480
 tttctgggca ccaattgtcc tccggttcgt gttaatggta aagggtgtct gccgggtggt 540
 aaagttaaac tgagcggtag cgtagcagc cagtatctga ccgcactgct gatggcagct 600
 ccgctggcac tgggtgatgt tgaaattgaa attgtggata aactgatttc tgtgccgtat 660
 gttgaaatga ccctgaaact gatggaacgt tttggtgtta gcgttgaaca tagcggtaat 720
 tgggatcgtt ttctggttca tgggtggccag aaatataaat ctccgggtaa tgcctttgtt 780
 gaaggtgatg caagcagcgc aagctatctg ctggcaggcg cagcaattac cgggtgtaca 840
 attaccgtta atggttgtgg caccagcagc ctgcagggcg atgttaaatt tgccgaagtg 900
 ctggaaaaaa tgggtgcaaa agtgacctgg tctgaaaata gcgttaccgt tagcgggtccg 960
 ccgcgtgatt ttagcggtcg taaagttctg cgtggcattg atgtgaatat gaacaaaatg 1020
 ccggatgttg ccatgaccct ggcagttgtt gccctgtttg caaatgggtc gaccgcaatt 1080
 cgtgatgttg caagctggcg tgttaaagaa accgaacgca tgattgcaat ttgtaccgaa 1140
 ctgcgtaaac tgggtgcaac cgttgaagaa ggtccggatt attgcgttat tacaccgccg 1200
 gaaaaactga atgttaccgc cattgatacc tatgatgatc atcgtatggc aatggcattt 1260
 agcctggcag catgtggtga tgttccggtg accattaaag atccgggttg tacacgtaaa 1320
 acctttccag attattttga agttctggaa cgcctgacca aacattaa 1368

<210> 16
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

<400> 16
 atgaccagcg aaaaagccag cgaaattgtt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcgggtctg 60
 attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc 120
 gaaggcacca ccgttggtga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat 180
 gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttggt 240
 gaagggtgtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat 300
 ctgggtaatg cagccaccgc aatgcgtccg ctgaccgcag cagttaccgc agccgggtgg 360
 aatgcaagct atgttctgga tgggtgttccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggatgatctg 420
 gttgttggtc tgaacagct ggggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg 480
 cctgttcgtg ttaatgcaaa tgggtggtctg cctgggtgga aagttaaact gagcggtagc 540
 attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggatgatgtt 600
 gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg 660
 atggaacgtt ttgggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa 720
 ggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggatgatgc aagcagcgca 780
 tcttattttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgcggt 840
 acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat gggttgtaaa 900
 gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg 960
 cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggatgttgc catgaccctg 1020
 gcagttgttg cactgtttgc agatgggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt 1080
 gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact gggtgcaacc 1140
 gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa 1200
 atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat 1260
 gttccggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa cctttccgga ttattttcag 1320
 gtgctggaaa gcatcaccaa acactaataa 1350

<210> 17
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Brassica napus

<400> 17
 atgaccagcg aaaaagccag cgaaattgtt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcgggtctg 60

attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc 120
 gaaggcacca ccgttggtga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat 180
 gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttggt 240
 gaaggttggtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat 300
 ctgggtaatg cagccaccgc aatgcgtagc ctgaccgcag cagttaccgc agccggtggt 360
 aatgcaagct atgttctgga tgggtgttccg cgtatgcgtg aacgtccgat tggatgatctg 420
 gttgttggtc tgaaacagct ggggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg 480
 cctgttcgtg ttaatgcaaa tgggtggtctg cctgggtggtg aagttaaact gagcggtagc 540
 attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggatgatgtt 600
 gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg 660
 atggaacggt ttgggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa 720
 ggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggtgatgc aagcagcgca 780
 tcttattttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgccgt 840
 acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat ggggtgtaaa 900
 gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg 960
 cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggatgttgc catgaccctg 1020
 gcagttgttg cactgtttgc agatggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt 1080
 gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact ggggtgcaacc 1140
 gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa 1200
 atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat 1260
 gttccggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa ctttccgga ttattttcag 1320
 gtgctggaaa gcatcaccaa acactaa 1347

<210> 18

<211> 1350

<212> ADN

<213> Brassica napus

<400> 18

atgaccagcg aaaaagccag cgaaattgtt ctgcagccga ttcgtgaaat tagcggctctg 60
 attaaactgc ctggtagcaa aagcctgagc aatcgtattc tgctgctggc agcactgagc 120
 gaaggcacca ccgttggtga taatctgctg aacagcgacg atattaacta tatgctggat 180
 gccctgaaaa aactgggtct gaatgttgaa cgtgatagcg ttaataatcg tgccgttggt 240
 gaaggttggtg gtggcatttt tccggcaagc ctggatagca aatccgatat cgaactgtat 300
 ctgggtaatg caggtattgc aatgcgtagc ctgaccgcag cagttaccgc agccggtggt 360

aatgcaagct atgttctgga tgggtgttccg cgtatgctg aacgtccgat tggatgatctg 420
 gttgtttggtc tgaacacagct ggggtgcagat gttgaatgta ccctgggcac caattgtccg 480
 cctgttctgtg ttaatgcaaa tgggtggtctg cctgggtggtg aagttaaact gagcggtagc 540
 attagcagcc agtatctgac cgcactgctg atggcagctc cgctggcact gggatgatgtt 600
 gaaatcgaga ttattgataa actgatcagc gttccgtatg ttgaaatgac cctgaaactg 660
 atggaacggtt ttgggtgttag cgcagaacat agcgatagct gggatcgctt ttttgttaaa 720
 ggtggccaga aatataaatc tccgggtaac gcctatgttg aaggatgatgc aagcagcgca 780
 tcttattttc tggcaggcgc agcaattacc ggtgaaaccg ttaccgttga aggttgccgt 840
 acaaccagcc tgcagggtga tgttaaattt gccgaagtgc tggaaaaaat gggttgtaaa 900
 gtgagctgga ccgaaaatag cgttaccgtt accggtccga gccgtgatgc atttggtatg 960
 cgtcatctgc gtgcagttga tgtgaacatg aacaaaatgc cggatgttgc catgaccctg 1020
 gcagttgttg cactgtttgc agatgggtccg accaccattc gtgatgttgc aagctggcgt 1080
 gttaaagaaa ccgaacgcat gattgcaatt tgtaccgaac tgcgtaaact gggtgcaacc 1140
 gttgaagaag gtagcgatta ttgcgttatt acccctccgg caaaagttaa accggcagaa 1200
 atcgatacct atgatgatca tcgtatggca atggcattta gcctggcagc atgtgcagat 1260
 gttccggtga ccattaaaga tccgggttgt acacgtaaaa cttttccgga ttattttcag 1320
 gtgctggaaa gcatcaccaa acactaataa 1350

<210> 19
 <211> 1371
 <212> ADN
 <213> Triticum aestivum

<400> 19
 atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag 60
 ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt 120
 attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc 180
 gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat 240
 aaagttgcaa aacgtgccgt tgttgttgggt tgtggtggtc gttttccggt tgaaaaagat 300
 gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccggta ccgcaatgcg tccgctgacc 360
 gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatgggtg tccgcgtatg 420
 cgtgaacgtc cgattgggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat 480
 tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaagggtg tctgccgggt 540
 ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca 600
 gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg 660

tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat	720
agctgggatac gctttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat	780
gttgaagggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc	840
accgttaccg ttgaagggtg tggtaacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa	900
gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt	960
ccgccgcgtc agccgttttg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa	1020
atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca	1080
attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc	1140
gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg	1200
ccggaaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca	1260
tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt	1320
aaaacctttc cgaattatth tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a	1371

<210> 20

<211> 1371

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<400> 20

atggcaacca gcgttgacgc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag	60
ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt	120
attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc	180
gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat	240
aaagttgcaa aacgtgccgt tgttggttgg tgtgggtggc gttttccggt tgaaaaagat	300
gcacaggaag aagttaaaact gtttctgggt aatgccgcaa ccgcaatgcg tccgctgacc	360
gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatgggtg tccgcgtatg	420
cgtgaacgtc cgattggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat	480
tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaagggtg tctgccgggt	540
ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca	600
gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg	660
tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgat	720
agctgggatac gctttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat	780
gttgaagggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc	840
accgttaccg ttgaagggtg tggtaacaacc agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa	900
gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt	960

ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacad ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa 1020
atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca 1080
attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc 1140
gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg 1200
ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca 1260
tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt 1320
aaaacctttc cgaattattt tgatgttctg agcacctttg tgaaaaatta a 1371

<210> 21

<211> 1371

<212> ADN

<213> Triticum aestivum

<400> 21

atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctggtg ccgaagaagt tgttctgcag 60
ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt 120
attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc 180
gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat 240
aaagttgcaa aacgtgccgt tgttggttgg tgtggtggtc gttttccggg tgaaaaagat 300
gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccgcaa ccgcaatgcg tagcctgacc 360
gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatggtgt tccgcgtatg 420
cgtgaacgtc cgattggtga tctggttgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat 480
tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaaggtgg tctgccgggt 540
ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca 600
gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg 660
tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttggtg ttaccgcaga acatagcgtat 720
agctgggatc gcttttatat taaaggtggc cagaaatata aatctccggg taatgcctat 780
gttgaaggtg atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc 840
accgttaccg ttgaaggttg tggtaaac accctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa 900
gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt 960
ccgccgcgtc agccgtttgg tcgtaaacad ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa 1020
atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca 1080
attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatggttgc aattcgtacc 1140
gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaaggtccgg attattgcat tattacaccg 1200
ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca 1260

tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt 1320
 aaaacctttc cgaattatatt tgatgtttctg agcacctttg tgaaaaatta a 1371

<210> 22
 <211> 1371
 <212> ADN
 <213> *Triticum aestivum*

<400> 22
 atggcaacca gcgttgcagc accggcagct ccgtctgggt ccgaagaagt tgttctgcag 60
 ccgattcgtg aaattagcgg tgcagttcag ctgcctggta gcaaaagcct gagcaatcgt 120
 attctgctgc tgtctgcact gagcgaaggc accaccgttg ttgataatct gctgaatagc 180
 gaagatgtgc attatatgct ggaagcactg gaagccctgg gtctgagcgt tgaagcagat 240
 aaagttgcaa aacgtgccgt tgttggttgg tgtgggtggc gttttccggg tgaaaaagat 300
 gcacaggaag aagttaaact gtttctgggt aatgccggta ttgcaatgcg tagcctgacc 360
 gcagcagttg ttgcagccgg tggtaatgca acctatgttc tggatgggtg tccgcgtatg 420
 cgtgaacgtc cgattgggtg tctgggtgtt ggtctgcagc agctgggtgc agatgcagat 480
 tgttttctgg gcaccaattg tcctccggtt cgtattaatg gtaaagggtg tctgccgggt 540
 ggtaaagtta aactgagcgg tagcattagc agccagtatc tgagcagcct gctgatggca 600
 gcaccgctgg cactggaaga tgtggaaatt gaaattattg ataaactgat tagcgtgccg 660
 tatgttgaaa tgaccctgaa actgatggaa cgttttgggt ttaccgcaga acatagcgtat 720
 agctgggatc gcttttatat taaagggtgg cagaaatata aatctccggg taatgcctat 780
 gttgaagggt atgcaagcag cgcaagctat tttctggcag gcgcagcaat taccggtggc 840
 accgttaccg ttgaagggtg tggtaacaac agcctgcagg gtgatgttaa atttgccgaa 900
 gtgctggaaa tgatgggtgc aaaagttacc tggaccgata ccagcgttac cgttaccggt 960
 ccgccgcgtc agccgttttg tcgtaaacat ctgaaagccg tggatgtgaa tatgaataaa 1020
 atgccggatg ttgccatgac cctggcagtt gttgccctgt ttgcagatgg tccgaccgca 1080
 attcgtgatg ttgcaagctg gcgtgttaaa gaaaccgaac gtatgggtgc aattcgtacc 1140
 gaactgacca aactgggtgc aaccgttgaa gaagggtccg attattgcat tattacaccg 1200
 ccggaaaaac tgaatattac cgccattgat acctatgatg atcatcgtat ggcaatggca 1260
 tttagcctgg cagcatgtgc agaagttccg gttaccattc gtgatccggg ttgtacacgt 1320
 aaaacctttc cgaattatatt tgatgtttctg agcacctttg tgaaaaatta a 1371

<210> 23
 <211> 1281
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces roseosporus*

<400> 23

atgaccgtta ttgaaattcc gggtagcaaa agcgttaccg cacgtgcact gtttctggca 60
 gcagcagcag atggcaccac caccctgctg cgtccgctgc gtagtgatga taccgaaggt 120
 tttgcagaag gtctgcgtaa tctgggttat gcagttgaac aggaagcaga tcgttggcgc 180
 gttcagggtc gtccggcagg tccggctgca accgaagcag atgtttattg tcgtgatggg 240
 gcaaccaccg cacgttttct gcctaccctg gcagccgcag ccgcaagcgg cacctatcgt 300
 tttgatgcaa gcgcacagat gcgtcgtcgt ccgctggcac cgctgaccgg tgcactgacc 360
 gcactgggtg ttgatctgcg tcatgaaggt gcagatggtc atcatccgct gaccgttcgt 420
 gcagcaggta ttgaagggtg tgaactgacc ctggatgccg gtgaaagcag ccagtatctg 480
 accgctctgc tgatgctggg tcctctgacc accaaaggtc tgcgcattga agttaccgaa 540
 ctgggttagcg caccgtatgt ggaaattacc ctggcaatga tgcgcgattt tgggtgtgaa 600
 gttgaacgtg aaggcaatac ctttaccgtt ccgagcccg gcagccgtct gcgtagcaat 660
 cgtggtgggtc cgattgggtg ttatcgtgca accacctatg ccgttgaacc ggatgcaagc 720
 accgcaagct atttttttgc agcagcagcc ctgaccggtc gtgaagttac cgttccgggt 780
 ctgggcacag gtgcaactgca gggtgatctg cgttttggtg atgttctgcg tgaaatgggt 840
 gcagaagtta gcgttgggtc ggatgccacc accgttcgta gcaccggctg tctgcgtggg 900
 attaccgtta atatgcgtga tattagcgat accatgccga cactggctgc aattgcaccg 960
 tatgcagatg gtccggttgt tattgaagat gttgcaaata cccgtgtgaa agaattgtat 1020
 cgtctggaag catgtgcaga aaatctgcgt gccatgggta ttaccgtgca taccgggtccg 1080
 gatcgtattg aaattcatcc gggtagaccg aaaccgaccg gtattgcaac ccatggtgat 1140
 catcgtattg ttatgagctt tgcagttgca ggtctgcgta caccgggtct gacctatgat 1200
 gatccggggtt gtgttcgtaa aacctttccg cgttttcatg aagtgtttgc agattttgcc 1260
 catgatctgg aaggtcgtta a 1281

<210> 24

<211> 1248

<212> ADN

<213> *Streptomyces griseus*

<400> 24

atgggtgcag ttaccgttat tgatattccg ggtagcaaaa gcgttaccgc acgtgcactg 60
 tttctggcag cagcagcaga tggcaccacc accctgctgc gtccgctgcg tagtgatgat 120
 accgaagggtt ttgcagaagg tctgaaaaat ctgggttatg cagttgaaca ggaagcagat 180
 cgttggcgcg ttgaagggtc tccggatggg ccggcagcac cggatgcaga tgtttattgt 240
 cgtgatgggtg caaccaccgc acgttttctg ccgaccctgg ttgcagcagc agccagcggc 300
 acctatcgtt ttgatgcaag gcacacagat gcgtcgtcgtc cgctggcacc gctgaccctg 360

gcactgaccg cactgggtgt tgatctgct catggtggtg aagaaggcca tcatccgctg 420
accgttcgtg cagcaggtat tgaagggtg gatgttgctc tggatgccgg tgaagcagc 480
cagtatctga ccgctctgct gatgctgggt cctctgaccg caaaaggctc gcgtattgaa 540
gttaccgatc tggtagcgc accgtatgtg gaaattaccc tggcaatgat gcgcgatttt 600
gggtgtgatg ttagccgtga aggtaatacc ttaccgttc cgagcgggtg ttatcgtgca 660
accgcctatg ccgttgaacc ggatgcaagc accgcaagct atttttttgc agcagccgca 720
ctgaccgggc gtgaagttac cgttccgggt ctgggtattg gtgactgca gggatgatctg 780
cgttttgttg atgttctgct tgatatgggt gccgaagtta gcgttgggtc ggatgccacc 840
accgttcgta gcaccggctg tctgcgtgggt attaccgtta ccatgctgta tattagtgt 900
accatgccga cactggcagc aattgcaccg catgccgatg gtccgggttcg tattgaagat 960
gttgcaaata cccgtgtgaa agaattgtgat cgtctggaag catgtgcaca gaatctgctg 1020
gcaatgggta ttaccgtgca taccggtcat gattggattg aaattctgcc tggtagaccg 1080
aaaccgaccg gtattgcaac ccatgggtgat catcgtattg ttatgagctt tgcagttgca 1140
gggtctgctga caccgggtct gacctatgat gatccgggtt gtgttcgtaa aacctttccg 1200
cgttttcatg aagtgtttgc agattttgca gcaagtccgc aggcataa 1248

<210> 25

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 25

gatgtttatt gccgtgatgg tggaaccacc gcacgttttc

40

<210> 26

<211> 40

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 26

gaaaacgtgc ggtggttcca ccatcacggc aataaacatc

40

<210> 27

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 27
 ggggccgctg gcacgtcagg gtctgcgtat tcg 33

<210> 28
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 28
 cgaatacgca gaccctgacg tgccagcgga cccagcagc 39

<210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 29
 catatgaccg ttattgaaat tccggg 26

<210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 30
 gatatacctat tattaacgac cttccag 27

<210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 31
 catatgggtg cagttaccgt tattga 26

<210> 32
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 32
 gatatacctat tattatgcct gcggac 26

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

 <220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

 <400> 33
 atgcttgcta gacaaggtgg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga 60
 agagttgaag ttgggtgctct tggtgttcct agacctatct ctgttaacga cggtgttcct 120
 cacgtttact ctgctccact ttctgttgct agaaggtctt gctctaagtc ctccattagg 180
 tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tct 213

 <210> 34
 <211> 186
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

 <400> 34
 atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttcatctgc ttcaaagaac 60
 cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttcct tgagcgtcag cgcattccagc 120
 gtcgcacctg cacctgcttg ctcatctcct gctggagctg gaaggcgtgc tggtgtcgtg 180
 agagca 186

 <210> 35
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

 <400> 35
 atggctcaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat 60
 ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag 120
 cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaaca cggtccgtg 180
 attcgtccgg ttaaggca 198

 <210> 36
 <211> 198
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

<400> 36
 atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc 60
 aaccaccgta agtcccccttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca 120
 tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacgggtcag tgattagacc cgtcaagggtg 180
 acagcttctg tttccgca 198

<210> 37
 <211> 225
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

<400> 37
 atggcacaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttcaaat 60
 ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctccgtct ccctcaagac acaccagcat 120
 ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcgggaat gactctgatt 180
 ggctctgagc ttctgtctct taagggttatg tcctctgttt ccgca 225

<210> 38
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

<400> 38
 atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60
 tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaactca gcagcccaga 120
 gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg 180
 gttaagggtga cagcctccgt ctccgct 207

<210> 39
 <211> 186
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

<400> 39
 atgatacttg gatctagccc aactctgcca cagcatcac atccagccag acctggctct 60
 gccagaccga tttcagtgaa cgacgtcggt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg 120
 gctaggcggt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc 180
 tgctca 186

<210> 40
 <211> 186
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

<400> 40
 atggcacaga tcaacaagtc tgctaattggg gtttaggaacg cttcactgat aagcaacttc 60
 tccaataccc gtcaagccaa atccccctttc tccctctcat gcggaacaag actgaagaac 120
 agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccggtgt caaagtgtct 180
 gcctca 186

<210> 41
 <211> 207
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Peptit xuyên lục lập

<400> 41
 atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat 60
 cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc 120
 tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tcctgctcta agtcatcaat ccgcagcact 180
 agaaggcttc agacgaccgt ttgttca 207

<210> 42
 <211> 1467
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-32 v3 và TraP14 v2

<400> 42
 atgatacttg gatctagccc aactctgcc aacgcatcac atccagccag acctggctct 60
 gccagaccga tttcagtgaa cgacgtcgtt ccccatgtct actccgctcc tctctccgtg 120
 gctaggcggt cttgtagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtagattgca gaccacagtc 180
 tgctcaatga cgggtataga gatacctggg tctaagtctg ttacagccag agcactgttc 240
 ttggcagctg ctgccgatgg gacgactact cttcttagac cattgcgtag cgatgacact 300
 gagggcttcg cagaaggact gaggaatctg ggctatgctg tggaacaaga ggctgatagg 360
 tggcgtgtcc aaggcagacc agctggacca gcagccacgg aagcagatgt ctattgcaga 420
 gatggtgccca ccaccgctag gttccttccg aactggcag cagcagctgc ttccggaacc 480

tacagattcg acgcttcagc acagatgcgt cgtcgtcccc ttgctccatt gacaagggca 540
 cttacagcct tgggtgtgga tcttagacac gaaggagcag acggacatca tccgctcacc 600
 gttcgtgcag ctggcatcga aggaggagaa ttgacgctcg acgctggcga gtccagccaa 660
 tacttgacag cactgctcat gctcggacct cttacaacaa agggacttcg catcgaagtt 720
 acagaactcg tctctgcacc ctacgtggaa atcaccctcg ctatgatgag agactttggt 780
 gtggagggttg agagggaggg gaataccttc accgttccaa gcccatcttc aagacttagg 840
 tccaatagag gtggacccat aggaggctat agagctacta cgtatgctgt cgagccagat 900
 gcctcaactg cctcttactt ctttgacgct gctgccctca ctggtcgcga ggtcacagtg 960
 cctggattgg ggactggagc tttgcaagggt gatttgcggt tcgtggatgt gctgagagaa 1020
 atgggtgccg aggtgtctgt tgggtccggac gccacaactg tgcgctcaac tggcagattg 1080
 aggggaatca ctgtgaacat gagagatatc tcagacacga tgcctacact cgcagctatt 1140
 gcaccttatg ccgatgggcc agtggtgatt gaagatgttg ccaacacccg tgtgaaggag 1200
 tgtgaccgtc tggaggcttg tgctgagaat ctgagggcaa tgggaatcac cgtccatacg 1260
 ggtccggata ggatagaaat ccacctgga acacctaacc cgactgggat cgccaccac 1320
 ggagatcacc gcatagtcac gtcatttgcc gtcgctggcc ttcgcactcc tggcctcact 1380
 tacgacgacc ctggctgcgt gcgtaagacc ttccctagat ttcacgaggt gtttgccgac 1440
 ttgctcacg accttgaggg aaggtga 1467

<210> 43
 <211> 1455
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-33 v3 và TraP24 v2

<400> 43
 atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggctcggga ggtcctctgc ctctaagaat 60
 cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttctgtga acgacgtcgt gccacacgtc 120
 tacagcgcac ctctgtccgt tgctagacgc tctgtctcta agtcatcaat ccgcagcact 180
 agaaggcttc agacgaccgt ttgttcaatg ggtgcagtga cagtcacga cattcctgga 240
 agcaagagcg tgacagcaag ggcaactctt ttggcagcag cagccgatgg aacgacaaca 300
 ctgcttcgtc ctctgaggtc agacgacacg gaggggtttg ccgaggggtct taagaatctc 360
 ggttatgccg ttgagcaaga ggctgaccgt tggagggctc aaggcagacc ggatgggtcca 420
 gctgctccgg atgcagatgt ctactgccgt gatggtgcaa cgactgcacg ctttcttcca 480
 accctcgtcg cagcagcagc ttctggaacg tatcgtttcg acgctcagc acagatgagg 540
 agacgtccct tggctccact cactagggca ctgacagctc ttggcgtgga ttgagacat 600

ggtggagagg agggatcatca tccactgact gtcagagctg ctggcataga aggtggcgat 660
 gttgtccttg acgctgggtga atcttctcag tatctcacag cccttcttat gttgggtccg 720
 ttgactgcca aaggctcttag aatcgaagtc actgatctcg tgagcgctcc ttacgttgaa 780
 atcactctgg ccatgatgag agatttcgga gttgatgtta gcagagaagg aaacactttc 840
 accgtgccgt ccggaggcta tagagctaca gcctacgctg tggagccaga cgcaagcacg 900
 gcttcttact tctttgcagc agctgccctc actggacgcg aggtgacggg ccctgggctg 960
 ggaattgggtg ctcttcaagg agaccttcgt tttgtggacg tgctgctga tatgggagca 1020
 gaggtgtctg ttggaccaga tgccacgaca gtgcgctcaa ctggcagact ccgtggcatt 1080
 acagttacta tgagagacat ttcagacacg atgccaacac tcgctgctat tgcacctcac 1140
 gctgatggac ccgtccgtat tgaggacgtg gcaaactc gtgtcaagga atgtgatagg 1200
 cttgaggcat gtgctcaaaa ccttagagct atgggaatca cgggtgcatac tgggcacgat 1260
 tggattgaga ttctccctgg gactccaaag ccaacgggaa tagctacgca cggagatcac 1320
 agaatcggtta tgtccttcgc agtggctggg ttgttgacct ctgggctgac atacgatgat 1380
 cctggctgcg tccgcaagac ttttccaagg ttccacgaag ttttcgctga ctttgctgca 1440
 tcaccccaag cctga 1455

<210> 44
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 44
 agccacatcc cagtaacga

19

<210> 45
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 45
 cctccctctt tgacgcc

17

<210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn dò oligonucleotit

<400> 46		
cagcccaatg aggcatcagc		20
<210> 47		
<211> 23		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 47		
cttcaaggag atttgggatt tgt		23
<210> 48		
<211> 17		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 48		
gagggtcggc atcgat		17
<210> 49		
<211> 25		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn dò oligonucleotit		
<400> 49		
agagaagttt cgacggattt cgggc		25
<210> 50		
<211> 22		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 50		
gaggattagg gtttcaacgg ag		22
<210> 51		
<211> 21		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 51		
gagaattgag ctgagacgag g		21

<210> 52
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 52
 ctgcaggtca acggatcagg atat 24

 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 53
 tgggctgaat tgaagacatg ctcc 24

 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 54
 cgtccacaaa gctgaatgtg 20

 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 55
 cgaagtcatg gaagccactt 20

 <210> 56
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 56
 cttcaaggag atttggggatt tgt 23

 <210> 57

<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	57	
	gaggggtcggc atcgtat	17
<210>	58	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	58	
	tgttcggttc cctctaccaa	20
<210>	59	
<211>	24	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn dò oligonucleotit	
<400>	59	
	cacagaaccg tcgcttcagc aaca	24
<210>	60	
<211>	22	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	60	
	caacatccat caccttgact ga	22
<210>	61	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn dò oligonucleotit	
<400>	61	
	cgagcagacc gccgtgtact tctacc	26
<210>	62	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	

<220>		
<223>	Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	62	
	tggcggacga cgacttgt	18
<210>	63	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	63	
	aaagtttgga ggctgccgt	19
<210>	64	
<211>	18	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	64	
	ttcagcaccc gtcagaat	18
<210>	65	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Trình tự đoạn dò oligonucleotit	
<400>	65	
	tgccgagaac ttgaggaggt	20
<210>	66	
<211>	17	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400>	66	
	tggtcgccat agcttgt	17
<210>	67	
<211>	72	
<212>	PRT	
<213>	Streptomyces griseus	
<400>	67	

Asp Arg Trp Arg Val Glu Gly Arg Pro Asp Gly Pro Ala Ala Pro Asp
 1 5 10 15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
 20 25 30

Thr Leu Val Ala Ala Ala Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser
 35 40 45

Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Ala Pro Leu Thr Arg Ala Leu Thr
 50 55 60

Ala Leu Gly Val Asp Leu Arg His
 65 70

<210> 68
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Streptomyces roseosporus

<400> 68

Asp Arg Trp Arg Val Gln Gly Arg Pro Ala Gly Pro Ala Ala Thr Glu
 1 5 10 15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
 20 25 30

Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ser Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser
 35 40 45

Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Ala Pro Leu Thr Arg Ala Leu Thr
 50 55 60

Ala Leu Gly Val Asp Leu Arg His
 65 70

<210> 69
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Streptomyces sviveus

<400> 69

Asp Thr Trp Gln Val Asp Gly Arg Pro Gln Gly Pro Ala Val Ala Glu
 1 5 10 15

Ala Asp Val Tyr Cys Arg Asp Gly Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro
 20 25 30

Thr Leu Ala Ala Ala Gly His Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Pro

35

40

45

Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu Leu Pro Leu Ser Arg Ala Leu Arg Asp
 50 55 60

Leu Gly Val Asp Leu Arg His
 65 70

<210> 70

<211> 70

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223> nguồn gốc chưa biết, được mô tả là SEQ ID NO:29 trong patent Mỹ số
 7834249

<400> 70

Asp Asp Trp Val Val Glu Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala
 1 5 10 15

Asp Ile Trp Cys Glu Asp Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro
 20 25 30

Phe Val Ala Ala Gly Gln Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln
 35 40 45

Leu Arg Arg Arg Pro Leu Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu
 50 55 60

Gly Ala Arg Val Ser Ser
 65 70

<210> 71

<211> 72

<212> PRT

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 71

Asp Thr Trp Ile Ile Asp Gly Val Gly Asn Gly Gly Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Glu Ala Pro Leu Asp Phe Gly Asn Ala Ala Thr Gly Cys Arg Leu Thr
 20 25 30

Met Gly Leu Val Gly Val Tyr Asp Phe Asp Ser Thr Phe Ile Gly Asp
 35 40 45

Ala Ser Leu Thr Lys Arg Pro Met Gly Arg Val Leu Asn Pro Leu Arg
 50 55 60

Glu Met Gly Val Gln Val Lys Ser
65 70

<210> 72
<211> 80
<212> PRT
<213> Brassica napus

<400> 72

Val Asn Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro Ala
1 5 10 15

Ser Leu Asp Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala Gly
20 25 30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn
35 40 45

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
50 55 60

Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu Cys
65 70 75 80

<210> 73
<211> 80
<212> PRT
<213> Glycine max

<400> 73

Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys Gly Gly Leu Phe Pro Thr
1 5 10 15

Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
20 25 30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
35 40 45

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
50 55 60

Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys
65 70 75 80

<210> 74
<211> 80
<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 74

Val Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys Gly Gly Arg Phe Pro Val
1 5 10 15

Glu Lys Asp Ala Gln Glu Glu Val Lys Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
20 25 30

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
35 40 45

Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
50 55 60

Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Gln Gln Leu Gly Ala Asp Ala Asp Cys
65 70 75 80

<210> 75

<211> 74

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 75

Asp Arg Thr Arg Cys Glu Ile Ile Gly Asn Gly Gly Pro Leu His Ala
1 5 10 15

Asp Gly Ala Leu Glu Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg
20 25 30

Pro Leu Ala Ala Ala Leu Cys Leu Gly Ser Asn Asp Ile Val Leu Thr
35 40 45

Gly Glu Pro Arg Met Lys Glu Arg Pro Ile Gly His Leu Val Asp Ala
50 55 60

Leu Arg Leu Gly Gly Ala Lys Ile Thr Tyr
65 70

<210> 76

<211> 516

<212> PRT

<213> Brassica napus

<400> 76

Met Ala Gln Ser Ser Arg Ile Cys His Gly Val Gln Asn Pro Cys Val
1 5 10 15

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser

29479

20	25	30
Val Ser Leu Lys Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys		
35	40	45
Lys Ser Gly Thr Met Leu Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys Val		
50	55	60
Thr Ala Ser Val Ser Thr Ser Glu Lys Ala Ser Glu Ile Val Leu Gln		
65	70	75
Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Leu Ile Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser		
	85	90
Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr		
	100	105
Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Asp Asp Ile Asn Tyr Met Leu Asp		
	115	120
Ala Leu Lys Lys Leu Gly Leu Asn Val Glu Arg Asp Ser Val Asn Asn		
	130	135
Arg Ala Val Val Glu Gly Cys Gly Gly Ile Phe Pro Ala Ser Leu Asp		
145	150	155
Ser Lys Ser Asp Ile Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met		
	165	170
Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Ser Tyr		
	180	185
Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu		
	195	200
Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Glu Cys Thr Leu Gly		
	210	215
Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Ala Asn Gly Gly Leu Pro Gly		
225	230	235
Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala		
	245	250
Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile		
	260	265
		270

Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu
 275 280 285

Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg
 290 295 300

Phe Phe Val Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Tyr
 305 310 315 320

Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala
 325 330 335

Ile Thr Gly Glu Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu
 340 345 350

Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met Gly Cys Lys
 355 360 365

Val Ser Trp Thr Glu Asn Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Ser Arg Asp
 370 375 380

Ala Phe Gly Met Arg His Leu Arg Ala Val Asp Val Asn Met Asn Lys
 385 390 395 400

Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp
 405 410 415

Gly Pro Thr Thr Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr
 420 425 430

Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr
 435 440 445

Val Glu Glu Gly Ser Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro Ala Lys Val
 450 455 460

Lys Pro Ala Glu Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala
 465 470 475 480

Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Asp Val Pro Val Thr Ile Lys Asp Pro
 485 490 495

Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Gln Val Leu Glu Ser
 500 505 510

Ile Thr Lys His
 515

<210> 77
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Glycine max

<400> 77

Met Ala Ser Val Ala Ala Ala Glu Lys Pro Ser Thr Ser Pro Glu Ile
 1 5 10 15

Val Leu Glu Pro Ile Lys Asp Phe Ser Gly Thr Ile Thr Leu Pro Gly
 20 25 30

Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu
 35 40 45

Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Tyr Ser Glu Asp Ile His Tyr
 50 55 60

Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Val Glu Asp Asp Lys
 65 70 75 80

Thr Thr Lys Gln Ala Ile Val Glu Gly Cys Gly Gly Leu Phe Pro Thr
 85 90 95

Ser Lys Glu Ser Lys Asp Glu Ile Asn Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly
 100 105 110

Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly Asn
 115 120 125

Ala Ser Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile
 130 135 140

Gly Asp Leu Val Ala Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys
 145 150 155 160

Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Gly Lys Gly Gly
 165 170 175

Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Val Ser Ser Gln Tyr
 180 185 190

Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu
 195 200 205

Ile Glu Ile Val Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met Thr
 210 215 220

Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Ser Val Glu His Ser Gly Asn
 225 230 235 240

Trp Asp Arg Phe Leu Val His Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly
 245 250 255

Asn Ala Phe Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Leu Leu Ala
 260 265 270

Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Ile Thr Val Asn Gly Cys Gly Thr
 275 280 285

Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Lys Met
 290 295 300

Gly Ala Lys Val Thr Trp Ser Glu Asn Ser Val Thr Val Ser Gly Pro
 305 310 315 320

Pro Arg Asp Phe Ser Gly Arg Lys Val Leu Arg Gly Ile Asp Val Asn
 325 330 335

Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu
 340 345 350

Phe Ala Asn Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val
 355 360 365

Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu
 370 375 380

Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Val Ile Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met
 405 410 415

Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Gly Asp Val Pro Val Thr Ile
 420 425 430

Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Glu Val
 435 440 445

Leu Glu Arg Leu Thr Lys His
 450 455

<210> 78
 <211> 456

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 78

Met Ala Thr Ser Val Ala Ala Pro Ala Ala Pro Ser Gly Ala Glu Glu
 1 5 10 15

Val Val Leu Gln Pro Ile Arg Glu Ile Ser Gly Ala Val Gln Leu Pro
 20 25 30

Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ser Ala Leu Ser
 35 40 45

Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Glu Asp Val His
 50 55 60

Tyr Met Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp
 65 70 75 80

Lys Val Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys Gly Gly Arg Phe Pro
 85 90 95

Val Glu Lys Asp Ala Gln Glu Glu Val Lys Leu Phe Leu Gly Asn Ala
 100 105 110

Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Val Ala Ala Gly Gly
 115 120 125

Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro
 130 135 140

Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Gln Gln Leu Gly Ala Asp Ala Asp
 145 150 155 160

Cys Phe Leu Gly Thr Asn Cys Pro Pro Val Arg Ile Asn Gly Lys Gly
 165 170 175

Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln
 180 185 190

Tyr Leu Ser Ser Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Glu Asp Val
 195 200 205

Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Val Pro Tyr Val Glu Met
 210 215 220

Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Thr Ala Glu His Ser Asp
 225 230 235 240

Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro
 245 250 255

Gly Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu
 260 265 270

Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly
 275 280 285

Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Met
 290 295 300

Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Asp Thr Ser Val Thr Val Thr Gly
 305 310 315 320

Pro Pro Arg Gln Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys Ala Val Asp Val
 325 330 335

Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala
 340 345 350

Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg
 355 360 365

Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Ile Ile Thr Pro
 385 390 395 400

Pro Glu Lys Leu Asn Ile Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg
 405 410 415

Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu Val Pro Val Thr
 420 425 430

Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asn Tyr Phe Asp
 435 440 445

Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 450 455

<210> 79

<211> 1464

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-28 v5 và TraP4 v2

<400> 79

atgcttgcta gacaaggtgg aagtctgaga gcttctcaat gcaacgctgg acttgctaga	60
agagttgaag ttggtgctct tgttgcttct agacctatct ctgttaacga cgttgcttct	120
cacgtttact ctgctccact ttctgttgct agaaggtctt gctctaagtc ctccattagg	180
tccactagaa ggcttcaaac tactgtgtgc tctgctgcaa gagggatgcc agccttgctct	240
ttacctggat caaagagtat cacagctagg gcactctttc ttgctgctgc tgcctgatggg	300
gttactactt tgggtgaggcc attgagaagt gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta	360
gttcgttttag gctatcgtgt agggaggaca cccgatactt ggcaagtcga tggcagacca	420
caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc tactgtagag acggagcaac caccgctaga	480
ttcttgccaa ccttagcagc tgctggctac ggaacataca gatttgatgc ttcaccacag	540
atgaggagac gtctcttttt gcccttaagc agagccttga gggatttgagg tgctgatctt	600
agacacgaag aagctgaagg tcatcaccct ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga	660
ggagaggtta ctttgatgc tggtcagtca agtcagtatc tcactgcctt gttgctcctt	720
ggtccctta caagacaagg actgaggata agggttactg atttggtgtc agcaccatac	780
gtggagatta cgcttgcaat gatgagggtc ttccgagttg aagtggcaag ggagggagat	840
gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt gcaactacgt atgctataga acccgacgca	900
agtactgctt cttacttctt cgcagctgct gctttgactc ctggagctga agtgactgta	960
cctgggttag gcacgggagc acttcaagga gatttgggat ttgtagatgt ctttaaggaga	1020
atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat gcaaccactg ttagaggaac tgggtgaattg	1080
cgtggcctta cagccaacat gagagacata agtgatacga tgccgaccct cgctgcaata	1140
gcacctttg ctagtgctcc agttagaato gaggatgttg ccaacactcg tgtcaaagaa	1200
tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagAAC cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg	1260
ggtccggact ggattgagat acacctggc ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat	1320
ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca gtgactggac ttctgtgtgc tgggatcagc	1380
ttcgacgacc ctggctgtgt tcgtaagact ttctctgggt ttcacgaggc ttctgcagaa	1440
ttgaggcgtg gcattgggag ctga	1464

<210> 80

<211> 1434

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-28 v5 và TraP5 v2

<400> 80
 atgcaactcc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttgggc gttcatctgc ttcaaagaac 60
 cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttctt tgagcgtcag cgcattccagc 120
 gtgcacactg cacttgcttg ctcatctcct gctggagctg gaaggcgtgc tgttgctgtg 180
 agagcagcaa gagggatgcc agccttgtct ttacctggat caaagagtat cacagctagg 240
 gcaactcttc ttgctgctgc tgcctgatgg gttactactt tggtagaggcc attgagaagt 300
 gacgacacag aaggattcgc tgaggggtta gttcgttttag gctatcgtgt agggaggaca 360
 cccgatactt ggcaagtcca tggcagacca caaggaccag cagtggctga ggctgacgtc 420
 tactgtagag acggagcaac caccgctaga ttcttgccaa ccttagcagc tgctggtcac 480
 ggaacataca gatttgatgc ttaccacag atgaggagac gtcctctttt gcccttaagc 540
 agagccttga gggatttggg tgcctgatctt agacacgaag aagctgaagg tcatcaccct 600
 ctgactgtcc gtgctgctgg ggttgaagga ggagagggtta ctttggatgc tggtcagtca 660
 agtcagtatc tcaactgcctt gttgctcctt ggtccctta caagacaagg actgaggata 720
 agggttactg atttgggtgc agcaccatac gtggagatta cgcttgcaat gatgagggt 780
 ttcggagttg aagtggcaag ggagggagat gtgttcgttg ttccacctgg tggatatcgt 840
 gcaactacgt atgctataga acccgacgca agtactgctt ctacttctt cgcagctgct 900
 gctttgactc ctggagctga agtgactgta cctgggttag gcacgggagc acttcaagga 960
 gatttgggat ttgtagatgt ctttaaggaga atgggagccg aggtgtccgt aggagctgat 1020
 gcaaccactg ttagaggaac tggatgaattg cgtggcctta cagccaacat gagagacata 1080
 agtgatacga tgccgaccct cgctgcaata gcaccctttg ctagtgctcc agttagaatc 1140
 gaggatgttg ccaacactcg tgtcaaagaa tgtgacagac ttgaggcttg tgcagagaac 1200
 cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg ggtccggact ggattgagat acaccctggt 1260
 ccagctactg gtgctcaagt cacaagctat ggtgatcaca gaattgtgat gtcatttgca 1320
 gtgactggac ttcgtgtgcc tgggatcagc ttcgacgacc ctggctgtgt togtaaagact 1380
 tttcctgggt ttcacgaggc tttcgcagaa ttgaggcgtg gcattgggag ctga 1434

<210> 81
 <211> 1446
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-28 v5 và TraP8 v2

<400> 81
 atggctcaat ctagcagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgtgtgat catttccaat 60
 ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagtca gcctcaagac tcaccagcag 120

cagcgtcgtg cttaccagat atctagctgg ggattgaaga agtcaaacaa cgggtccgtg 180
 attcgtccgg ttaaggcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt 240
 atcacagcta gggcactcct tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg 300
 ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggctatcgt 360
 gtagggagga cccccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct 420
 gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattccttgc aaccttagca 480
 gctgctggtc acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctcct 540
 ttgcccttaa gcagagcctt gagggatttg ggtgtcgatc ttagacacga agaagctgaa 600
 ggtcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagaggt tactttggat 660
 gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgctcc ttgggtccct tacaagacaa 720
 ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca 780
 atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct 840
 ggtggatata gtgcaactac gtatgctata gaaccgcagc caagtactgc ttcttacttc 900
 ttgcagctg ctgctttgac tcctggagct gaagtgactg tacctgggtt aggcacggga 960
 gcacttcaag gagatttggg atttgtagat gtcttaagga gaatgggagc cgaggtgtcc 1020
 gtaggagctg atgcaaccac tgtagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
 atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctgcgtgcaa tagcaccctt tgctagtgtc 1140
 ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct 1200
 tgtgcagaga accttaggag gttgggagta agggttgcaa cgggtccgga ctggattgag 1260
 atacaccctg gtccagctac tgggtgctcaa gtcacaagct atggtgatca cagaattgtg 1320
 atgtcatttg cagtgactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt 1380
 gttcgtaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgag aattgaggcg tggcattggg 1440
 agctga 1446

<210> 82

<211> 1446

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-28 v5 và TraP9 v2

<400> 82

atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccattgtgtga tatccaatct ccccaaaagc 60
 aaccaccgta agtccccctt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca 120
 tggggactta agaagtctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtcaagggtg 180
 acagcttctg tttccgcagc aagagggatg ccagccttgt ctttacctgg atcaaagagt 240

atcacagcta gggcactctt tcttgctgct gctgctgatg gggttactac tttggtgagg 300
 ccattgagaa gtgacgacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggcatacgt 360
 gtagggagga cacccgatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct 420
 gaggctgacg tctactgtag agacggagca accaccgcta gattccttgcc aaccttagca 480
 gctgctggtc acggaacata cagatttgat gcttcaccac agatgaggag acgtcctctt 540
 ttgcccttaa gcagagcctt gagggatttg ggtgtcgatc ttagacacga agaagctgaa 600
 ggtcatcacc ctctgactgt ccgtgctgct ggggttgaag gaggagagggt tactttggat 660
 gctggtcagt caagtcagta tctcactgcc ttgttgctcc ttggtcccct tacaagacaa 720
 ggactgagga taagggttac tgatttggtg tcagcaccat acgtggagat tacgcttgca 780
 atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttcgt tgttccacct 840
 ggtggatata gtgcaactac gtatgctata gaaccgcagc caagtactgc ttcttacttc 900
 ttgcagctg ctgctttgac tcctggagct gaagtgactg tacctggggtt aggcacggga 960
 gcacttcaag gagatttggg atttgtagat gtcttaagga gaatgggagc cgagggtgtcc 1020
 gtaggagctg atgcaaccac tgtagagga actggtgaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
 atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctgctgcaa tagcaccctt tgctagtgtc 1140
 ccagttagaa tcgaggatgt tgccaacact cgtgtcaaag aatgtgacag acttgaggct 1200
 tgtgcagaga accttaggag gttgggagta agggttgcaa cgggtccgga ctggattgag 1260
 atacaccctg gtccagctac tgggtgtcaa gtcacaagct atgggtgatca cagaattgtg 1320
 atgtcatttg cagtgactgg acttcgtgtg cctgggatca gcttcgacga ccctggctgt 1380
 gttcgtgaaga cttttcctgg gtttcacgag gctttcgcag aattgaggcg tggcattggg 1440
 agctga 1446

<210> 83

<211> 1473

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-28 v5 và TraP12 v2

<400> 83

atggcacaat ctacgagaat ctgccacggg gtgcagaacc catgtgtgat catttcaa 60
 ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctccgtct ccctcaagac acaccagcat 120
 ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggaat gactctgatt 180
 ggctctgagc ttctgctctt taaggttatg tcctctgttt ccgcagcaag agggatgcca 240
 gccttgtctt tacctggatc aaagagtatc acagctaggg cactctttct tgetgctgct 300

gctgatgggg ttactacttt ggtgaggcca ttgagaagtg acgacacaga aggattcgct 360
 gaggggttag ttcgtttagg ctatcgtgta gggaggacac ccgatacttg gcaagtcgat 420
 ggcagaccac aaggaccagc agtggctgag gctgacgtct actgtagaga cggagcaacc 480
 accgctagat tcttgccaac cttagcagct gctgggtcacg gaacatacag atttgatgct 540
 tcaccacaga tgaggagacg tcctcttttg cccttaagca gagccttgag ggatttgggg 600
 gtcgatctta gacacgaaga agctgaagggt catcacccctc tgactgtccg tgctgctggg 660
 gttgaaggag gagaggttac ttgggatgct ggtcagtcaa gtcagtatct cactgccttg 720
 ttgctccttg gtccctttac aagacaagga ctgaggataa gggttactga tttgggtgtca 780
 gcaccatacg tggagattac gcttgcaatg atgagggctt tcggagttga agtggcaagg 840
 gagggagatg tgttcgttgt tccacctggg ggatatcgtg caactacgta tgctatagaa 900
 cccgacgcaa gtactgcttc ttacttcttc gcagctgctg ctttgactcc tggagctgaa 960
 gtgactgtac ctggggttagg cacgggagca cttcaaggag atttgggatt tgtagatgtc 1020
 ttaaggagaa tgggagccga ggtgtccgta ggagctgatg caaccactgt tagaggaaact 1080
 ggtgaattgc gtggccttac agccaacatg agagacataa gtgatacgat gccgaccctc 1140
 gctgcaatag caccctttgc tagtgctcca gttagaatcg aggatgttgc caacactcgt 1200
 gtcaaagaat gtgacagact tgaggcttgt gcagagaacc ttaggaggtt gggagtaagg 1260
 gttgcaacgg gtccggactg gattgagata caccctggtc cagctactgg tgctcaagtc 1320
 acaagctatg gtgatcacag aattgtgatg tcatttgcag tgactggact tcgtgtgcct 1380
 gggatcagct tcgacgaccc tggtgtgtgt cgtaagactt ttcttgggtt tcacgaggtc 1440
 ttgcgagaat tgaggcgtgg cattgggagc tga 1473

<210> 84
 <211> 1455
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Dung hợp trong khung đọc giữa dgt-28 v5 và TraP13 v2

<400> 84
 atggcacaag ttagcagaat ctgtaatggg gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc 60
 tcaaagtcca gccaacgtaa gtctcccctc agcgtgtctc tgaaaaactca gcagcccaga 120
 gcttcttcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt cattcgtccg 180
 gttaagggtga cagcctccgt ctccgctgct agagggatgc cagccttgctc ttacctgga 240
 tcaaagagta tcacagctag ggcactcttt cttgctgctg ctgctgatgg ggttactact 300
 ttggtgaggg cattgagaag tgacgacaca gaaggattcg ctgaggggtt agttcgttta 360
 ggctatcgtg tagggaggac acccgatact tggcaagtcg atggcagacc acaaggacca 420

gcagtggctg aggctgacgt ctactgtaga gacggagcaa ccaccgctag attcttgcca 480
accttagcag ctgctgggtca cggaacatac agatttgatg cttcaccaca gatgaggaga 540
cgtcctcttt tgcccttaag cagagccttg agggatttggt gtgtcgatct tagacacgaa 600
gaagctgaag gtcattcacc tctgactgtc cgtgctgctg gggttgaagg aggagagggtt 660
actttggatg ctggtcagtc aagtcagtat ctactgcct tgttgctcct tgggtcccctt 720
acaagacaag gactgaggat aagggttact gatttggtgt cagcaccata cgtggagatt 780
acgcttgcaa tgatgagggc tttcggagtt gaagtggcaa gggagggaga tgtgttcggt 840
gttccacctg gtggatatcg tgcaactacg tatgctatag aaccgcacgc aagtactgct 900
tcttacttct tcgcagctgc tgctttgact cctggagctg aagtgactgt acctgggtta 960
ggcacgggag cacttcaagg agatttgga tttgtagatg tcttaaggag aatgggagcc 1020
gaggtgtccg taggagctga tgcaaccact gttagaggaa ctggtgaatt gcgtggcctt 1080
acagccaaca tgagagacat aagtgatacg atgcccaccc tcgctgcaat agcacccttt 1140
gctagtgtc cagttagaat cgaggatgtt gccaacactc gtgtcaaaga atgtgacaga 1200
cttgaggctt gtgcagagaa ccttaggagg ttgggagtaa gggttgcaac ggggtccggac 1260
tggattgaga tacaccctgg tccagctact ggtgctcaag tcacaagcta tggatgacac 1320
agaattgtga tgtcatttgc agtgactgga cttcgtgtgc ctgggatcag cttcgacgac 1380
cctggctgtg ttcgtaagac ttttcctggg tttcacgagg ctttcgcaga attgaggcgt 1440
ggcattggga gctga 1455

<210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 85
gcgaagatcc aggacaagga 20

<210> 86
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 86
ctgcttaccg gcaaagatga g 21

<210> 87

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

 <220>
 <223> Trình tự đoạn dò oligonucleotit

 <400> 87
 ttcccccgga ccagcagcgt 20

 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 88
 ccgacgagaa agaccagcaa 20

 <210> 89
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 89
 ttaagttgtc gatcgggact gt 22

 <210> 90
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn dò oligonucleotit

 <400> 90
 tgagcctctc gtcgccgatc acat 24

 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 91
 attttccatt cacttggccc 20

 <210> 92
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 92
 tgctatctgg ctcagctgc 19

 <210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn dò oligonucleotit

 <400> 93
 atggtggaag ggcggttg a 21

 <210> 94
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 94
 ctcccgcgca ccgatctg 18

 <210> 95
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 95
 cccgcccctc tcctctttc 19

 <210> 96
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn dò oligonucleotit

 <400> 96
 aagccgcctc tcgcccaccc a 21

 <210> 97
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 97	
ggtttgttga atccctctgt tgg	24
<210> 98	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400> 98	
gtggatcatga cagtatgata acagg	25
<210> 99	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400> 99	
gggtctgccc aatgaagcga	20
<210> 100	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400> 100	
tctcgcttct ctcataacac atcgtg	26
<210> 101	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400> 101	
gacctctctc accctctctc tc	22
<210> 102	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit	
<400> 102	
ccaaataata agtgagagag gggcat	26

<210> 103
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 103
 tagttcccct gtcgtgtgca aa 22

 <210> 104
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 104
 caacagcagc ctcaccaatc ac 22

 <210> 105
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 105
 caagaacggg gctccttttt taag 24

 <210> 106
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 106
 agcccttcct ctgcatcctt a 21

 <210> 107
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 107
 ggctgtgttg cacacaaata gaga 24

 <210> 108

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

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 108
 cagcagcacg gtaggtagat tgt 23

 <210> 109
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 109
 ccgataagac ggcaactgat taaa 24

 <210> 110
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 110
 aggctggcct ctagtggaag gag 23

 <210> 111
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 111
 gggtttccgg ctggagacg 19

 <210> 112
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 112
 ccaaaagcaa ttttcgttat aagatgcc 28

 <210> 113
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 113
 ccagataatc tgtgggctcc tg 22

 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 114
 gcagcagctt gccttaagca 20

 <210> 115
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 115
 tgcttggttc tggtgtcatc ataggtt 27

 <210> 116
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 116
 catttggttg gtttccacgt acg 23

 <210> 117
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 117
 gagcgcggt aaaggtcaaa ac 22

 <210> 118
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 118		
ccgatttaca tggacttgat ggagt		25
<210> 119		
<211> 24		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 119		
ggtttggtga atccctctgt tgg		24
<210> 120		
<211> 32		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 120		
gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag		32
<210> 121		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 121		
gggtctgccc aatgaagcga		20
<210> 122		
<211> 37		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 122		
gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg		37
<210> 123		
<211> 32		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit		
<400> 123		
gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag		32

<210> 124
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 124
 ccaaataata agtgagagag gggcat 26

 <210> 125
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 125
 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

 <210> 126
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 126
 caacagcagc ctcaccaatc ac 22

 <210> 127
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 127
 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

 <210> 128
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 128
 agcccttcct ctgcatacctt a 21

 <210> 129

<211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 129
 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

<210> 130
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 130
 cagcagcacg gtaggtagat tgt 23

<210> 131
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 131
 gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag 32

<210> 132
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 132
 aggctggcctt ctagtggaag gag 23

<210> 133
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 133
 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

<210> 134
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 134
 ccaaaaagcaa ttttcgttat aagatgcc 28

 <210> 135
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 135
 gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag 32

 <210> 136
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 136
 gcagcagctt gccttaagca 20

 <210> 137
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 137
 gccgcctcca taatgtgtga gtagttccca gataagg 37

 <210> 138
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 138
 catttggttg gtttccacgt acg 23

 <210> 139
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 139
 gccgcctcca gtgagtgttg ctgcttgtgt ag 32

<210> 140
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 140
 ccgatttaca tggacttgat ggagt 25

<210> 141
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự polypeptit

<400> 141
 Leu Gly Asn Ala Ala Thr
 1 5

<210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự polypeptit

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa có thể là Ala, Ser, hoặc Thr

<400> 142
 Ala Leu Leu Met Xaa Ala Pro Leu Thr
 1 5

<210> 143
 <211> 1431
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Cấu trúc DGT-31 và TRAP23

<400> 143
 atggcacaga tcaacaagtc tgctaattggg gtttaggaacg cttcactgat aagcaacttc 60

tccaataccc gtcaagccaa atccccctttc tccctotcat gcggaacaag actgaagaac 120

agcagcagag gtttgaagaa ggtggcagtt aggctcattg gctcccgtgt caaagtgtct 180
 gcctcaatga ctgtgattga catccctggc tcaaagtcag ttactgccag agcattgttc 240
 ctgcgacgag ctgctgatgg cactacaact cttttgagac ctcttcacag cgatgacacg 300
 gaaggcttca ctgaggggtct cactcgtttg ggatacgcag tggttagaga acccgatagg 360
 tggcacatag aaggacgtcc ctccgggtcca gcagcagcag atgcagaagt tcaactgtagg 420
 gacggtgcta caactgctcg ctttcttcca acccttgacg ctgctgctgc ctccggaacg 480
 tatcgtttcg acgcatcagc tcagatgagg cgtagacccc tcgctcccct cacggaagct 540
 cttagaacac ttggagtggg ccttaggcat gatggagctg aaggccacca ccccttgaca 600
 attcaagcct ctggtgttaa ggggtggagga cttacgctcg acgctggtga gtcattctcag 660
 tacttgacag ctctgctcat gcttggtcct ctgaccgcag agggactgag aatagaagtt 720
 acggagcttg tctctgctcc ttatgtggag atcacccttg caatgatgag aggcttttgtt 780
 gtggaggttg ttagggaggg gaatactttc actgtgcctc ctggagggtta cagagctaca 840
 acttatgcca tagaaccgga cgcaagcaca gcttcctact tctttgcagc agcagccctc 900
 actgggaggg aagtgcagg gcttggttg ggcactggag cacttcaagg tgatcttagg 960
 ttcacggagg tcctcagaag gatggacgct gatgttcgca caacgtccga ctctacaaca 1020
 gtgcgctcag atggtcgctt tgctgggttg actgtcaaca tgagggacat aagcgacaca 1080
 atgccaacac tggcagctat agctccgtac gcaagctcac cagttaggat cgaggatgct 1140
 gcaaacaccc gtgtgaagga atgtgatagg ctggaggctt gcgctcagaa tctccgctca 1200
 atgggcatca ccgttcgcac tggaccagat tggattgaga tccatcctgg gactcctaga 1260
 ccgaccgaga tagccacaca cggtgatcat agaatcgta tgcattttgc cgtggctgga 1320
 cttagaacc ctgggatgct ttacgatgac cctggctgcg ttgcgaagac ttttcctcgt 1380
 tttcatgaag agtttgcagc cttcgtggag cgctcatccg ctggagagtg a 1431

<210> 144

<211> 1245

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nucleotit DGT-31 v3

<400> 144

atgactgtga ttgacatccc tggctcaaag tcagttactg ccagagcatt gttcctcgca 60
 gcagctgctg atggcactac aactcttttg agacctcttc acagcgatga cacggaaggc 120
 ttcaactgagg gtctcactcg tttgggatac gcagtgggtta gagaacccga taggtggcac 180
 atagaaggac gtccctccgg tccagcagca gcagatgcag aagttcactg tagggacggt 240
 gctacaactg ctgcgtttct tccaaccctt gcagctgctg ctgcctccgg aacgtatcgt 300

```

ttcgacgcat cagctcagat gaggcgtaga cccctcgctc ccctcacgga agctcttaga      360
acacttggag tggaccttag gcatgatgga gctgaaggcc accacccctt gacaattcaa      420
gcctctggtg ttaaggggtg aggacttacg ctcgacgctg gtgagtcacg tcagtacttg      480
acagctctgc tcatgcttgg tcctctgacc gcagagggac tgagaataga agttacggag      540
cttgtctctg ctcccttatgt ggagatcacc cttgcaatga tgagaggctt tgggtgtggag      600
gttgttaggg aggggaatac tttcactgtg cctcctggag gttacagagc tacaacttat      660
gccatagaac cggacgcaag cacagcttcc tacttctttg cagcagcagc cctcactggg      720
aggggaagtga cgggtgcctgg cttgggcact ggagcacttc aagggtgatct taggttcacg      780
gaggtcctca gaaggatgga cgctgatggt cgcaaacgt ccgactctac aacagtgcgc      840
tcagatggtc gccttgctgg gttgactgtc aacatgaggg acataagcga cacaatgccg      900
acactggcag ctatagctcc gtacgcaagc tcaccagtta ggatcgagga tgtcgcaaac      960
accctgtgta agaatgtga taggctggag gcttgcgctc agaatctccg ctcaatgggc     1020
atcacggttc gactggacc agattggatt gagatccatc ctgggactcc tagaccgacc     1080
gagatagcca cacacggtga tcatagaatc gtcatgtcat ttgccgtggc tggacttaga     1140
accctggga tgtcttacga tgaccctggc tgcgttcgca agacttttcc tcgttttcat     1200
gaagagtttg cagccttcgt ggagcgctca tccgctggag agtga                       1245

```

<210> 145
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Protein DGT-31

<400> 145

```

Met Thr Val Ile Asp Ile Pro Gly Ser Lys Ser Val Thr Ala Arg Ala
1           5           10           15

```

```

Leu Phe Leu Ala Ala Ala Ala Asp Gly Thr Thr Thr Leu Leu Arg Pro
          20           25           30

```

```

Leu His Ser Asp Asp Thr Glu Gly Phe Thr Glu Gly Leu Thr Arg Leu
          35           40           45

```

```

Gly Tyr Ala Val Val Arg Glu Pro Asp Arg Trp His Ile Glu Gly Arg
          50           55           60

```

```

Pro Ser Gly Pro Ala Ala Ala Asp Ala Glu Val His Cys Arg Asp Gly
65           70           75           80

```

Ala Thr Thr Ala Arg Phe Leu Pro Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ser
85 90 95

Gly Thr Tyr Arg Phe Asp Ala Ser Ala Gln Met Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

Ala Pro Leu Thr Glu Ala Leu Arg Thr Leu Gly Val Asp Leu Arg His
115 120 125

Asp Gly Ala Glu Gly His His Pro Leu Thr Ile Gln Ala Ser Gly Val
130 135 140

Lys Gly Gly Gly Leu Thr Leu Asp Ala Gly Glu Ser Ser Gln Tyr Leu
145 150 155 160

Thr Ala Leu Leu Met Leu Gly Pro Leu Thr Ala Glu Gly Leu Arg Ile
165 170 175

Glu Val Thr Glu Leu Val Ser Ala Pro Tyr Val Glu Ile Thr Leu Ala
180 185 190

Met Met Arg Gly Phe Gly Val Glu Val Val Arg Glu Gly Asn Thr Phe
195 200 205

Thr Val Pro Pro Gly Gly Tyr Arg Ala Thr Thr Tyr Ala Ile Glu Pro
210 215 220

Asp Ala Ser Thr Ala Ser Tyr Phe Phe Ala Ala Ala Ala Leu Thr Gly
225 230 235 240

Arg Glu Val Thr Val Pro Gly Leu Gly Thr Gly Ala Leu Gln Gly Asp
245 250 255

Leu Arg Phe Thr Glu Val Leu Arg Arg Met Asp Ala Asp Val Arg Thr
260 265 270

Thr Ser Asp Ser Thr Thr Val Arg Ser Asp Gly Arg Leu Ala Gly Leu
275 280 285

Thr Val Asn Met Arg Asp Ile Ser Asp Thr Met Pro Thr Leu Ala Ala
290 295 300

Ile Ala Pro Tyr Ala Ser Ser Pro Val Arg Ile Glu Asp Val Ala Asn
305 310 315 320

Thr Arg Val Lys Glu Cys Asp Arg Leu Glu Ala Cys Ala Gln Asn Leu
325 330 335

Arg Ser Met Gly Ile Thr Val Arg Thr Gly Pro Asp Trp Ile Glu Ile
340 345 350

His Pro Gly Thr Pro Arg Pro Thr Glu Ile Ala Thr His Gly Asp His
355 360 365

Arg Ile Val Met Ser Phe Ala Val Ala Gly Leu Arg Thr Pro Gly Met
370 375 380

Ser Tyr Asp Asp Pro Gly Cys Val Arg Lys Thr Phe Pro Arg Phe His
385 390 395 400

Glu Glu Phe Ala Ala Phe Val Glu Arg Ser Ser Ala Gly Glu
405 410