



(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)



1-0029870

(51)⁷ C07K 14/37; C12N 5/10; C12N 15/63; (13) B
C12N 15/82; A01H 5/00; C12N 15/04

(21) 1-2017-03003

(22) 04/01/2016

(86) PCT/CN2016/070035 04/01/2016

(87) WO 2016/110229 A1 14/07/2016

(30) 201510003843.1 06/01/2015 CN

(45) 25/10/2021 403

(43) 27/11/2017 356A

(73) Pherobio Technology Co., Ltd (CN)

Building 59A, No. 17 Huanke Central Road, Jinqiao Science and Technology
Industrial base, Tongzhou garden, Zhongguancun Science and Technology Park,
Tongzhou District, Beijing 101102, China.

(72) Junsheng QI (CN); Zhizhong GONG (CN); Xuhui HONG (CN).

(74) Công ty TNHH Lê & Lê (LE & LE)

(54) PROTEIN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG BỆNH VÀ GEN MÃ HÓA CỦA NÓ,
VẬT LIỆU SINH HỌC LIÊN QUAN ĐẾN PROTEIN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP
TẠO RA THỰC VẬT BIẾN ĐỔI GEN CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH

(57) Sáng chế đề cập đến protein liên quan đến tính kháng bệnh và gen mã hóa của nó. Protein được đề xuất là: a) protein có trình tự axit amin như trình tự axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO: 1; b) protein liên quan đến tính kháng bệnh và thu được sau khi trình tự axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự bị thay thế và/hoặc xóa và/hoặc bổ sung một hoặc một vài đơn phân axit amin; c) protein với trình tự axit amin như SEQ ID NO: 1; hoặc d) protein liên quan đến tính kháng bệnh và thu được sau khi trình tự axit amin như SEQ ID NO: 1 bị thay thế và/hoặc xóa và/hoặc bổ sung một hoặc một vài đơn phân axit amin. Các thí nghiệm chứng minh rằng protein liên quan đến tính kháng bệnh và gen mã hóa của nó có thể được sử dụng để tăng cường tính kháng bệnh ở thực vật.

Sáng chế còn đề cập đến sản phẩm để điều tiết tính kháng bệnh của thực vật, và phương pháp tạo ra thực vật biến đổi gen có khả năng kháng bệnh.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protein liên quan đến tính kháng bệnh và gen mã hóa của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bông là một cây hoa màu quan trọng ở Trung Quốc, và hàng dệt bông chiếm vị trí quan trọng trong thương mại xuất khẩu của Trung Quốc. Bệnh héo Verticillium là một bệnh quan trọng nhất ở cây bông, với diện tích ảnh hưởng tái diễn hàng năm hơn ba triệu đến bốn triệu hm^2 ở Trung Quốc, chiếm hơn 70% diện tích trồng bông. Điều này thường gây ra việc cắt bỏ 20%-30%, đến 60%-70% ở vùng nhiễm bệnh nặng, thậm chí là mất mùa. Lượng bông mất đi hàng năm do bệnh héo Verticillium lên đến một triệu tấn, và chất lượng sợi bông giảm đi đáng kể sau đợt bệnh. Hiện nay, giống bông *Gossypium hirsutum* được trồng với quy mô lớn ở Trung Quốc rất khó đạt được mức độ kháng bệnh cao với bệnh héo Verticillium. Giống *Gossypium barbadense*, mặc dù có khả năng kháng lại bệnh héo Verticillium, nhưng không thể trồng trên diện rộng vì năng suất thấp, sự nhạy cảm với bệnh héo Fusarium, đòi hỏi nhiệt độ tích lũy cao, v.v. Từ năm 1950, những nhà nhân giống bông ở Trung Quốc đã cố gắng kết hợp các gen kháng bệnh của loài *Gossypium barbadense* vào loài *Gossypium hirsutum* bằng cách lai tạo, để tạo ra các giống có khả năng kháng cao với bệnh héo Verticillium và có năng suất cao, nhưng đều thất bại. Liu Haiyang và cộng sự (2012) đã báo cáo rằng, trong số 120 giống được trồng ở khu vực trồng bông chính và các khu vực thử nghiệm, chỉ duy nhất một giống ở giữa kháng bệnh héo Verticillium và kháng bệnh, và còn lại là các giống chịu bệnh và nhạy cảm với bệnh. Do vậy, cần phải tách dòng gen liên quan đến khả năng kháng bệnh từ giống

Gossypium barbadense, và biểu hiện gen này vào giống *Gossypium hirsutum* năng suất cao bằng phương pháp biến đổi gen, để tạo ra các giống năng suất cao và kháng lại *Verticillium dahliae*. Điều này sẽ có ý nghĩa quan trọng trong việc gia tăng sản xuất bông, cải thiện thu nhập của nông dân, đảm bảo an toàn cho bông ở Trung Quốc, và thúc đẩy sự phát triển kinh tế quốc gia.

Côn trùng và bệnh chính ở cây bông bao gồm bệnh héo Fusarium, bệnh héo Verticillium, và sâu bướm *Helicoverpa armigera*. Bệnh héo Verticillium không chỉ có khu vực ảnh hưởng rộng, mà còn có khu vực bị bệnh nặng tăng cao. Các chủng gây bệnh rụng lá mạnh đặc biệt gây thiệt hại nghiêm trọng, và 71,9% các chủng gây rụng lá là vi khuẩn gây bệnh mạnh. Từ năm 1993, bệnh héo Verticillium đã thường xuyên bùng phát ở Trung Quốc. Năm 2003, sự bùng phát bệnh héo Verticillium trên quy mô lớn đã đồng thời xảy ra ở khu vực sông Hoàng Hà, khu vực sông Dương Tử, và khu vực trồng giống *Gossypium hirsutum* ở phía tây. Năm 2006, bệnh héo Verticillium đã tấn công khu vực trồng bông của Jiluyu (các tỉnh Hà Bắc, Sơn Đông và Hà Nam của Trung Quốc) một cách nghiêm trọng, và hơn 70% tổng diện tích bông của các tỉnh này đã bị mắc bệnh nghiêm trọng. Hiện nay, khu tự trị Tân Cương đã trở thành khu vực trồng bông chính ở Trung Quốc, và với sự phổ biến của phương pháp tưới nhỏ giọt dưới màng phủ, sự ảnh hưởng của bệnh héo Verticillium cũng tăng nhanh.

Sự xuất hiện của bệnh héo Verticillium không chỉ làm giảm sự tạo thành xơ bông, mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng bông. Bệnh héo Verticillium thường được chia thành năm mức độ từ Mức độ 0 đến Mức độ IV, và để đo tính kháng bệnh của một giống, chỉ số bệnh này thường được sử dụng. Với bệnh héo Verticillium, các chỉ số bệnh ở mức 0-10, 11-20, 21-35, và cao hơn 35 tương ứng với khả năng chống chịu cao, khả năng kháng bệnh, khả năng chịu bệnh và nhạy cảm với bệnh. Sau khi bông bị nhiễm bệnh, số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây sẽ bị giảm đi đáng kể do thiếu hụt nguồn cung cấp chất dinh dưỡng. Khi bệnh trở nên nghiêm

trọng, số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây sẽ thấp hơn 50% so với điều kiện bình thường (khi đó số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây là khoảng 18). Trong trường hợp như vậy, ngay cả khi quả nang không rụng bớt, thì trọng lượng mỗi quả bông cũng sẽ giảm đi đáng kể. Người ta ước tính rằng, sự bùng phát bệnh héo do *Verticillium* năm 2003 đã làm giảm sự tạo thành xơ bông lên đến 230 triệu kilogam, gây thiệt hại trực tiếp cho nền kinh tế 3 tỷ RMB. Sau đó, bệnh héo do *Verticillium* gây thiệt hại kinh tế hơn 1 tỷ RMB mỗi năm ở Trung Quốc. Sau khi bị nhiễm bệnh, bông có khả năng chống chịu cao sẽ chịu chất lượng sợi xấu đi đáng kể, bao gồm làm giảm độ mịn chung 20%, giảm độ bền 22%, và giảm chiều dài 2 mm. Bệnh héo *Verticillium* gây ra bởi vi khuẩn *Verticillium dahlia* ở Trung Quốc. Một khi đã ở trong đất, vi khuẩn này sẽ tồn tại được hơn 20 năm. Vì thế mà bệnh héo *Verticillium* được biết đến như bệnh “ung thư” ở cây bông. Bệnh héo *Verticillium* đã thu hút sự chú ý ở Trung Quốc trong việc nghiên cứu và kiểm soát nó từ năm 1972, nhưng vẫn chưa được kiểm soát hiệu quả cho đến thời điểm này. Hiện nay, việc kiểm soát bệnh héo *Verticillium* chủ yếu bao gồm kiểm soát hóa học, kiểm soát sinh học, kiểm soát nông nghiệp, và kiểm soát nhân giống kháng bệnh. Kiểm soát hóa học có hiệu quả kiểm soát nhất định, nhưng cũng gây ra ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Kiểm soát sinh học, sử dụng *Trichoderma spp.*, tạo ra hiệu quả kiểm soát nhất định, tuy nhiên, hiệu quả của kiểm soát sinh học phần lớn phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Và việc kiểm soát nông nghiệp lâu dài khó đạt được ở Trung Quốc. Kiểm soát nhân giống kháng bệnh, mục đích là tạo ra các giống kháng bệnh, là phương pháp hiệu quả nhất về chi phí. Do vậy, giải pháp hiệu quả nhất về chi phí với vấn đề bông kháng với bệnh héo *Verticillium* là tách dòng gen liên quan đến tính kháng bệnh, tạo ra các giống bông mới bằng phương pháp biến đổi gen, và tăng cường khả năng đề kháng với *Verticillium*.

Việc sử dụng phương pháp biến đổi gen để tạo ra các nguồn gen mới và trồng các giống kháng bệnh là cách tiếp cận hiệu quả nhất về chi phí để kiểm soát bệnh héo *Verticillium*. Giống *Gossypium barbadense L.*, mặc dù có khả năng kháng cao

với bệnh héo Verticillium do chứa gen liên quan đến tính kháng bệnh, nhưng không được trồng trên diện tích lớn do năng suất thấp. Và gen kháng bệnh của nó rất khó để tích hợp vào bộ gen của *Gossypium hirsutum* bằng cách lai tạo. Do vậy, giải pháp tốt nhất là tách dòng gen liên quan đến tính kháng bệnh héo Verticillium từ *Gossypium barbadense*, biến nạp gen này vào *Gossypium hirsutum* L., và tạo ra giống vừa có năng suất cao vừa có khả năng kháng bệnh héo Verticillium wilt. Di truyền học phân tử hiện đại đã làm cho việc tách dòng các gen có liên quan đến tính kháng bệnh trở nên dễ dàng. Trong những năm gần đây, các nhà nghiên cứu trên thế giới đã tạo ra những quy trình đặc hiệu để tách dòng gen kháng Verticillium (gen R), biến nạp gen kháng vi sinh vật phổ rộng, và biến nạp gen liên quan đến tính kháng bệnh từ *Gossypium barbadense*. Nghiên cứu trên đã mở rộng các nguồn gen kháng bệnh héo Verticillium, và tạo nền tảng cho việc tạo ra các giống biến đổi gen có khả năng kháng Verticillium. Thêm vào đó, trong những năm gần đây, với nghiên cứu sâu về cơ chế tương tác giữa thực vật với các mầm bệnh, người ta thấy rằng PTI (miễn dịch kích hoạt bởi PAMP, phản ứng miễn dịch gây ra bởi yếu tố gây bệnh ngoại bào) và ETI (miễn dịch kích hoạt bởi cơ quan đáp ứng kích thích, phản ứng miễn dịch gây ra bởi yếu tố đáp ứng kích thích nội bào) là hai phương thức kích hoạt miễn dịch ở thực vật. Trong các nghiên cứu về bệnh héo Verticillium, các nhà khoa học Hà Lan đã lần đầu tiên chứng minh được cơ chế PTI có thể thích ứng với thực vật kháng Verticillium dahliae, trong khi có chế kháng bệnh héo Verticillium nội bào đến nay vẫn chưa được báo cáo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật được giải quyết bởi sáng chế này là làm thế nào để tăng khả năng kháng bệnh ở thực vật.

Để giải quyết vấn đề kỹ thuật nêu trên, sáng chế này đầu tiên đề xuất một protein.

Protein được đề xuất bởi sáng chế này, có tên là VdAL, là một protein như sau:

- a) protein có trình tự axit amin là trình tự axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO:1;
 - b) protein mà liên quan đến tính kháng bệnh và thu được sau khi trình tự axit amin như trình tự axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO:1 trong danh mục trình tự bị thay thế và/hoặc xóa và/hoặc bổ sung một hoặc một vài đơn phân axit amin;
 - c) protein với trình tự chuỗi axit amin như trong SEQ ID NO:1; và
 - d) protein mà liên quan đến tính kháng bệnh và thu được sau khi trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO:1 trong danh mục trình tự bị thay thế và/hoặc xóa và/hoặc bổ sung một hoặc một vài đơn phân axit amin,
- trong đó SEQ ID NO:1 chứa 287 axit amin, và trình tự axit amin từ 265-287 của chuỗi SEQ ID NO:1 có chứa trình tự axit amin FLAG.

Để thuận lợi cho việc tinh chế protein trong mục a), một đoạn mồi như trong Bảng 1 được gắn vào đầu amino hoặc đầu cacboxy của protein được chỉ ra trong SEQ ID NO:1 trong danh mục trình tự.

Bảng 1: Các trình tự mồi

Mồi	Số lượng đơn phân	Trình tự
Poly-Arg	5-6 (thường là 5)	RRRRR
Poly-His	2-10 (thường là 6)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

VdAL trong mục b) hoặc d) trên đây có thể được tổng hợp nhân tạo, hoặc thu được bằng cách tổng hợp từ gen mã hóa nó và sau đó biểu hiện sinh học. Gen mã

hóa VdAL trong mục b) trên đây có thể thu được sau khi codon của một hoặc một vài đơn phân axit amin bị xóa khỏi trình tự ADN như trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO:2 trong danh mục trình tự, và/hoặc sau đột biến mất đoạn của một hoặc một vài bazơ trong đó, và/hoặc sau khi trình tự chuỗi mã hóa đoạn mồi như trong Bảng 1 được cộng hợp vào đầu 5' và/hoặc đầu 3' của nó.

Để giải quyết vấn đề kỹ thuật trên, sáng chế đề xuất thêm một vật liệu sinh học chứa VdAL.

Vật liệu sinh học được đưa ra bởi sáng chế, mà có liên quan đến protein VdAL, là một loại được chọn lọc trong nhóm bao gồm từ B1) đến B22) như sau:

- B1) phân tử axit nucleic mã hóa VdA1;
- B2) cát-xét biểu hiện gen chứa phân tử axit nucleic B1);
- B3) vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic B1);
- B4) vector tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện B2);
- B5) vi sinh vật tái tổ hợp chứa axit nucleic B1);
- B6) vi sinh vật tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện B2);
- B7) vi sinh vật tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp B3);
- B8) vi sinh vật tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp B4);
- B9) dòng tế bào thực vật biến đổi gen chứa phân tử axit nucleic B1);
- B10) dòng tế bào thực vật biến đổi gen chứa cát-xét biểu hiện B2);
- B11) dòng tế bào thực vật biến đổi gen chứa vector tái tổ hợp B3);
- B12) dòng tế bào thực vật biến đổi gen chứa vector tái tổ hợp B4);
- B13) mô thực vật biến đổi gen chứa phân tử axit nucleic B1);
- B14) mô thực vật biến đổi gen chứa cát-xét biểu hiện B2);
- B15) mô thực vật biến đổi gen chứa vector tái tổ hợp B3);
- B16) mô thực vật biến đổi gen chứa vector tái tổ hợp B4);
- B17) cơ quan thực vật biến đổi gen chứa phân tử axit nucleic B1);
- B18) cơ quan thực vật biến đổi gen chứa cát-xét biểu hiện B2);

- B19) cơ quan thực vật biến đổi gen chứa vector tái tổ hợp B3);
 B20) cơ quan thực vật biến đổi gen chứa vector tái tổ hợp B4);
 B21) thực vật biến đổi gen chứa phân tử axit nucleic B1); và
 B22) thực vật biến đổi gen chứa cát-xét biểu hiện B2).

Trong các vật liệu sinh học trên, phân tử axit nucleic B1) là một gen được đại diện bởi:

- 1) phân tử cADN hoặc ADN với trình tự nucleotit là trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO:2 trong Danh mục trình tự;
- 2) phân tử cADN hoặc ADN bậc lộ 75% hoặc giống nhiều hơn với trình tự nucleotit được xác định trong mục 1) và mã hóa cho VdAl;
- 3) phân tử cADN hoặc ADN mà lai ghép, dưới các điều kiện nghiêm ngặt, với trình tự nucleotit được xác định trong mục 1) và mã hóa cho VdAl;
- 4) phân tử cADN hoặc ADN với trình tự chuỗi nucleotit như SEQ ID NO:2 trong Danh mục trình tự;
- 5) phân tử cADN hoặc ADN mà bậc lộ 75% hoặc giống nhiều hơn với trình tự nucleotit được xác định trong mục 4) và mã hóa cho VdAl; hoặc
- 6) phân tử cADN hoặc ADN mà lai ghép, dưới các điều kiện nghiêm ngặt, với trình tự nucleotit được xác định trong mục 4) và mã hóa cho VdAl.

Phân tử axit nucleic có thể là ADN, chẳng hạn như cADN, ADN hệ gen, và ADN tái tổ hợp. Hoặc phân tử axit nucleic cũng có thể là ARN, chẳng hạn như mARN và hnARN.

SEQ ID NO: 2 bao gồm 864 nucleotit mã hóa trình tự axit amin như SEQ ID NO: 1. Trình tự nucleotit từ 793-864 của SEQ ID NO: 2 mã hóa cho FLAG có trình tự như trình tự axit amin 265-287 của SEQ ID NO: 1; và trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 mã hóa cho protein có trình tự chuỗi axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO: 1.

Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng cho phép xảy ra đột biến trên trình tự nucleotit mã hóa cho protein VdAL của sáng chế này, sử dụng các phương pháp đã biết, chẳng hạn như tiến hóa có định hướng và đột biến điểm. Các nucleotit mà đã bị biến đổi nhân tạo và bậc lệ 75% hoặc giống nhiều hơn với trình tự nucleotit của VdAL được phân lập trong sáng chế này, miễn là chúng vẫn mã hóa cho VdAL và có chức năng của VdAL, là các trình tự nucleotit bắt nguồn từ sáng chế này và tương đương với trình tự chuỗi của sáng chế.

Như đã đề cập trong tài liệu này, thuật ngữ “giống” đề cập đến sự tương tự về trình tự với trình tự axit nucleic tự nhiên. “Giống” có nghĩa là một trình tự nucleotit có độ tương tự 75% hoặc hơn, 85% hoặc hơn, 90% hoặc hơn, hoặc 95% hoặc hơn với trình tự nucleotit mã hóa cho protein có chứa trình tự axit amin như SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO: 1 của sáng chế này. Sự giống có thể được đánh giá bằng mắt thường hoặc bằng phần mềm máy tính. Khi sử dụng phần mềm máy tính, sự giống nhau của hai hay nhiều trình tự chuỗi có thể biểu hiện ở dạng phần trăm (%), có thể được đánh giá sự giống nhau giữa các trình tự chuỗi có liên quan.

Trong các vật liệu sinh học trên, các điều kiện nghiêm ngặt bao gồm lai ở nhiệt độ 68°C trong đệm 2×SSC với SDS 0,1%, tiếp theo là rửa màng hai lần mỗi lần 5 phút, và sau đó lai ở nhiệt độ 68 °C trong đệm 0,5×SSC với SDS 0,1%, tiếp theo là rửa màng hai lần mỗi lần 15 phút; hoặc cách khác là lai ở nhiệt độ 65 °C trong đệm 0,1×SSPE (hoặc 0,1×SSC) với SDS 0,1%, tiếp theo là rửa màng.

Sự giống 75% hoặc hơn có thể là giống 80%, 85%, 90%, 95% hoặc hơn.

Trong các vật liệu sinh học trên, cát-xét biểu hiện B2) (cát-xét biểu hiện gen VdAL) bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa VdAL đề cập đến một ADN có khả năng biểu hiện VdAL trong tế bào chủ. ADN không chỉ bao gồm một chất hoạt hóa khởi động quá trình phiên mã của gen VdAL, mà còn bao gồm một chất kết thúc để

kết thúc quá trình phiên mã của gen VdAL. Cát-xét biểu hiện có thể chứa thêm các trình tự tăng cường. Chất hoạt hóa có thể được sử dụng trong sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, chất hoạt hóa cơ định, và chất hoạt hóa đặc hiệu cho các mô, các cơ quan và sự phát triển, và chất hoạt hóa cảm ứng. Các ví dụ về chất hoạt hóa bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, chất hoạt hóa cơ định 35S của virus khảm súp lơ, chất hoạt hóa cảm ứng bởi chấn thương từ cây cà chua, leucine aminopeptidase (“LAP,” Chao và cộng sự (1999) *Plant Physiol* 120: 979-992); chất hoạt hóa cảm ứng hóa học từ cây thuốc lá, protein 1 liên quan đến sinh bệnh học (PR1) (cảm ứng bởi axit salicylic và BTH (este S-methyl benzothiadiazole-7-carbothioic axit)); chất hoạt hóa ức chế proteaza II ở cà chua (PIN2) hoặc chất hoạt hóa LAP (tất cả có thể cảm ứng với methyl jasmonat); chất hoạt hóa sốc nhiệt (US 5,187,267); chất hoạt hóa cảm ứng với tetracyclin (US 5,057,422); chất hoạt hóa đặc hiệu cho hạt, chẳng hạn như chất hoạt hóa đặc hiệu cho hạt kê (*Setaria italica*) pF128 (CN 101063139B (số đơn CN 200710099169,7), chất hoạt hóa đặc hiệu cho protein dự trữ trong hạt (ví dụ như, các chất hoạt hóa phaseolin, napin, oleosin, và beta conglyxin từ đậu nành (Beachy và cộng sự (1985) *EMBO J.* 4: 3047-3053)). Chúng có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với các chất hoạt hóa thực vật khác. Tất cả các tài liệu tham khảo được trích dẫn được tập hợp trong tài liệu này bằng cách tham chiếu với tính toàn vẹn của nó. Các chất kết thúc phiên mã thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn bởi, chất kết thúc tổng hợp nopaline từ *Agrobacterium* (chất kết thúc NOS), chất kết thúc 35S virus khảm súp lơ (CaMV), chất kết thúc tml, chất kết thúc rbcS E9 từ đậu Hà Lan, và chất kết thúc nopaline và octopine syntas (xem, ví dụ, Odell và cộng sự (1988) *Nature*, 313: 810; Rosenberg và cộng sự (1987) *Gene*, 56: 125; Guerineau và cộng sự (1991) *Mol. Gen. Genet*, 262: 141; Proudfoot (1991) *Cell*, 64: 671; Sanfacon và cộng sự, *Genes Dev.*, 5: 141; Mogen và cộng sự (1990) *Plant Cell*, 2: 1261; Munroe và cộng sự (1990) *Gene*, 91: 151; Ballad và cộng sự, *Nucleic Acids Res.*, 17: 7891; và Joshi và cộng sự (1987) *Nucleic Acid Res.*, 15: 9627).

Một vector biểu hiện hiện nay có thể được dùng để xây dựng một vector tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện của gen VdAL. Vector biểu hiện thực vật bao gồm các vector của tumefaciens *Agrobacterium* nhị thể, một vector có thể được sử dụng cho phương pháp bắn gen ở thực vật, và các loại tương tự, chẳng hạn như pAHC25, pBin438, pCAMBIA1302, pCAMBIA2301, pCAMBIA1301, pCAMBIA1300, pBI121, pCAMBIA1391-Xa, hoặc pCAMBIA1391-Xb (CAMBIA). Vector biểu hiện thực vật có thể chứa vùng không dịch mã ở đầu 3' của một gen khác, nghĩa là một dấu hiệu gắn đuôi poly(A) và bất kỳ một mảnh ADN khách liên quan đến xử lý mARN hoặc biểu hiện gen có thể bao gồm trong đó. Dấu hiệu gắn đuôi poly(A) có thể dẫn đến việc gắn đuôi poly(A) vào đầu 3' của một tiền mARN. Ví dụ, gen plasmit cảm ứng bởi bệnh sùi cành do *Agrobacterium* (Ti) (chẳng hạn như gen *nopaline synthase* *Nos*), và vùng không dịch mã được phiên mã ở đầu 3' của gen thực vật (chẳng hạn gen mã hóa protein dự trữ ở đậu nành) tất cả có chức năng tương tự. Khi gen trong sáng chế này được sử dụng để xây dựng vector biểu hiện thực vật, đoạn tăng cường, bao gồm đoạn tăng cường dịch mã hay đoạn tăng cường phiên mã, cũng có thể được sử dụng. Vùng tăng cường, có thể là bộ ba khởi động ATG, bộ ba khởi động ở vùng kế tiếp, hoặc tương tự, phải trùng với khung đọc mở của trình tự chuỗi mã hóa, để đảm bảo dịch đúng toàn bộ chuỗi. Tín hiệu kiểm soát dịch mã và bộ ba khởi động, mà có nhiều nguồn khác nhau, có thể là tự nhiên hoặc tổng hợp. Vùng khởi động dịch mã có thể bắt nguồn từ một vùng khởi động phiên mã hoặc một gen cấu trúc. Để thuận lợi cho việc nhận dạng và sàng lọc các tế bào thực vật và các cây biến đổi gen, một vector biểu hiện thực vật có thể được xử lý thông qua, ví dụ, thêm vào một gen mà có thể được biểu hiện ở thực vật mà có thể mã hóa cho một enzym tạo ra màu hoặc tổng hợp một hợp chất phát quang (chẳng hạn như gen *GUS* và gen luciferaza), gen chỉ thị kháng sinh (chẳng hạn như gen *nptII* mà mang lại khả năng kháng kanamycin và các kháng sinh liên quan, gen *bar* mà mang lại khả năng kháng thuốc diệt cỏ, gen *hph* mà mang lại khả năng kháng kháng sinh hygromycin, gen *dhfr* mà mang lại khả năng kháng metotrexat, và gen EPSPS mà mang lại khả

năng kháng gene glyphosat), gen chỉ thị phản ứng chất hóa học (chẳng hạn như gen kháng thuốc diệt cỏ), hoặc gen mã hóa mannoza-6-phosphate isomeraza mà mang lại khả năng chuyển hóa mannoza. Để đảm bảo an toàn cho thực vật biến đổi gen, chúng có thể được biến đổi trực tiếp bằng cách sàng lọc ngược mà không cần gen chỉ thị chọn lọc.

Trong vật liệu sinh học trên, vector có thể là vector plasmit, vector cosmit, vector phagơ, hoặc vector virut.

Trong vật liệu sinh học trên, vi sinh vật có thể là nấm men, vi khuẩn, tảo hoặc nấm sợi, chẳng hạn như *Agrobacterium*.

Trong vật liệu sinh học trên, cơ quan thực vật biến đổi gen có thể là hạt của cây biến đổi gen. Cây biến đổi gen (ví dụ, cây ngô) có thể bao gồm hạt, mô sẹo, cây nguyên vẹn và tế bào. Cây ngô biến đổi gen có thể bao gồm hạt, mô sẹo, cây nguyên vẹn và tế bào.

Trong một phương án của sáng chế, gen mã hóa VdAL (tức ADN đại diện bởi trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2) được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 qua một vector tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện của gen mã hóa VdAL. Vector tái tổ hợp là pSPT01-VdAL thu được bằng cách thay thế một đoạn giữa hai vị trí nhận biết *Sal* I và *Kpn* I trên pSPT01 bằng một phân tử ADN có trình tự như đoạn nucleotit từ 1-792 SEQ ID NO: 2. Vector pSPT01-VdAL biểu hiện protein VdAL như SEQ ID NO: 1.

Trong một phương án khác của sáng chế, gen mã hóa VdAL (cụ thể là phân tử ADN đại diện bởi các nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2) được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 qua một vector tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện của gen mã hóa VdAL. Vector tái tổ hợp là pCAMBIA1300-Super-VdAL thu được bằng cách thay thế một đoạn giữa hai vị trí nhận biết *Pst* I và *Kpn* I trên pCAMBIA1300-Super bằng phân tử ADN có trình tự như đoạn nucleotit từ 1-792

của SEQ ID NO: 2. pCAMBIA1300-Super-VdAL biểu hiện protein VdAL như SEQ ID NO: 1.

Để giải quyết vấn đề kỹ thuật trên, sáng chế đưa ra thêm việc sử dụng VdAL hoặc vật liệu sinh học trong:

- a) điều hòa tính kháng bệnh của thực vật; hoặc
- b) tạo ra thực vật biến đổi gen kháng bệnh.

Trong việc sử dụng trên, thực vật có thể là thực vật hai lá mầm hoặc thực vật một lá mầm.

Trong việc sử dụng trên, tính kháng bệnh có thể là tính kháng bệnh héo Verticillium.

Trong việc sử dụng trên, thực vật có thể là thực vật hai lá mầm hoặc thực vật một lá mầm; và tính kháng bệnh có thể là tính kháng bệnh héo Verticillium.

Trong việc sử dụng trên, thực vật hai lá mầm có thể là thực vật chi *Gossypium*. Thực vật chi *Gossypium* có thể là cây bông. Cây bông cụ thể là giống SGK9708-41.

Để giải quyết vấn đề kỹ thuật trên, sáng chế đưa ra thêm phương pháp tạo ra thực vật biến đổi gen kháng bệnh.

Phương pháp tạo ra thực vật biến đổi gen kháng bệnh đưa ra trong sáng chế bao gồm bước đưa gen mã hóa VdAL vào cây nhận, để thu được cây biến đổi gen có tính kháng bệnh cao hơn cây nhận.

Trong phương pháp trên, gen mã hóa VdAL có thể là phân tử ADN với trình tự chuỗi mã hóa như trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự.

Trong phương pháp trên, thực vật có thể là thực vật hai lá mầm và/hoặc thực vật một lá mầm.

Trong phương pháp trên, tính kháng bệnh có thể là tính kháng bệnh héo Verticillium.

Trong phương pháp trên, gen mã hóa VdAL có thể là một phân tử ADN có trình tự mã hóa như trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự; và thực vật có thể là thực vật hai lá mầm và/hoặc thực vật một lá mầm.

Trong phương pháp trên, gen mã hóa VdAL có thể là một phân tử ADN có trình tự mã hóa như trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự; và tính kháng bệnh có thể là tính kháng bệnh héo Verticillium.

Trong phương pháp trên, thực vật có thể là thực vật hai lá mầm và/hoặc thực vật một lá mầm; và tính kháng bệnh có thể là tính kháng bệnh héo Verticillium.

Trong phương pháp trên, gen mã hóa VdAL có thể là một phân tử ADN có trình tự mã hóa như trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự; thực vật có thể là thực vật hai lá mầm và/hoặc thực vật một lá mầm; và tính kháng bệnh có thể là tính kháng bệnh héo Verticillium.

Trong phương pháp trên, gen mã hóa VdAL có thể là một phân tử ADN có trình tự mã hóa như trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự.

Trong phương pháp trên, thực vật hai lá mầm có thể là thực vật chi *Gossypium*. Thực vật chi *Gossypium* có thể là cây bông. Cây bông cụ thể là giống SGK9708-41.

Trong một phương án của sáng chế, gen mã hóa VdAL (cụ thể là phân tử ADN như SEQ ID NO: 2) được đưa vào cây đích thông qua một vector biểu hiện tái tổ hợp gen VdAL có chứa cắt-xét biểu hiện gen VdAL.

Trong phương pháp trên, gen VdAL có thể bị biến đổi trước rồi sau đó được đưa vào cây nhận có hạt để đạt được hiệu quả biểu hiện tốt hơn.

Ngay từ đầu, việc biến đổi và tối ưu hóa có thể được thực hiện theo yêu cầu thực tế để làm cho việc biểu hiện gen được hiệu quả. Ví dụ, phụ thuộc vào bộ ba mã hóa thích hợp của cây nhận, mà bộ ba mã hóa của gen VdAL có thể được lựa chọn trong khi trình tự axit amin của nó vẫn giữ nguyên để phù hợp với sự tương thích của thực vật. Trong một quy trình tối ưu hóa, cần duy trì một hàm lượng GC nhất định trong trình tự mã hóa đã được tối ưu để đạt được mức độ biểu hiện cao nhất của gen được đưa vào thực vật, trong đó hàm lượng GC có thể là 35%, nhiều hơn 45%, nhiều hơn 50 %, hoặc nhiều hơn 60%.

Bên cạnh đó, một trình tự gen kế tiếp methionin khởi đầu có thể được biến đổi để làm cho việc khởi động dịch mã được hiệu quả. Ví dụ, một trình tự hiệu quả đã được biết đến ở thực vật có thể được sử dụng cho việc biến đổi.

Hơn nữa, việc ghép nối các chất hoạt hóa biểu hiện của các thực vật khác nhau có thể được thực hiện để làm thuận lợi cho việc biểu hiện gen VdAL ở thực vật. Các chất hoạt hóa có thể bao gồm chất hoạt hóa cơ định, chất hoạt hóa cảm ứng, chất hoạt hóa điều hòa bởi thời gian, chất hoạt hóa điều hòa bởi hóa học, chất hoạt hóa tối ưu hóa mô, và chất hoạt hóa đặc hiệu mô. Sự chọn lọc chất hoạt hóa thay đổi theo yêu cầu về thời gian và không gian biểu hiện, và cũng phụ thuộc vào loài. Ví dụ, một chất hoạt hóa biểu hiện đặc hiệu của một mô hoặc một cơ quan phụ thuộc vào giai đoạn phát triển mà thụ thể được yêu cầu. Mặc dù đã chứng minh được rằng nhiều chất hoạt hóa bắt nguồn từ các thực vật hai lá mầm vẫn có chức năng ở thực vật một lá mầm và ngược lại, nhưng người ta vẫn mong chọn được các chất hoạt hóa của thực vật hai lá mầm để biểu hiện ở thực vật hai lá mầm, và chất hoạt hóa của thực vật một lá mầm để biểu hiện ở thực vật một lá mầm.

Thêm vào đó, việc ghép nối các chất kết thúc cũng có thể được thực hiện để cải thiện hiệu quả biểu hiện của gen trong sáng chế, chẳng hạn như tml có nguồn gốc từ CaMV và E9 từ rbcS. Bất kỳ chất kết thúc có sẵn nào đã được biết đến là có chức năng ở thực vật đều có thể được ghép nối với gen của sáng chế này.

Hơn nữa, một trình tự tăng cường, chẳng hạn như một đoạn intron (cụ thể là từ Adh1 hoặc đồng) và một trình tự dẫn từ virus (cụ thể là từ TMV, MCMV, hoặc AMV) có thể được đưa vào.

Vector biểu hiện tái tổ hợp chứa gen VdAL có thể được đưa vào một tế bào thực vật bằng các phương pháp công nghệ sinh học thông thường như plasmid Ti, vector virus thực vật, biến đổi ADN trực tiếp, vi tiêm, và xung điện (Weissbach, 1998, "Method for Plant Molecular Biology VIII," Academy Press, New York, pp. 411-463; Geiserson and Corey, 1998, *Plant Molecular Biology* (2nd Edition)).

Trong phương pháp trên, thực vật biến đổi gen được hiểu không chỉ bao gồm thực vật biến đổi gen thế hệ thứ nhất thu được từ việc biến nạp gen VdAL vào cây đích, mà còn là thế hệ sau của chúng. Đối với thực vật biến đổi gen, gen có thể được nhân lên trong chính loài thực vật biến đổi gen, hoặc cũng có thể được chuyển sang các giống khác cùng loài, đặc biệt là các giống thương mại, thông qua các phương pháp kỹ thuật nhân giống thông thường. Thực vật biến đổi gen có thể là hạt, mô sẹo, cây nguyên vẹn hoặc là tế bào.

Để giải quyết vấn đề kỹ thuật trên, sáng chế đưa ra sản phẩm để điều hòa tính kháng bệnh của thực vật.

Sản phẩm điều hòa tính kháng bệnh của thực vật được đưa ra bởi sáng chế bao gồm protein VdAL hoặc các vật liệu sinh học.

Hoạt chất của sản phẩm điều hòa tính kháng bệnh của thực vật có thể là VdAL hoặc là các vật liệu sinh học.

Sản phẩm điều hòa tính kháng bệnh của thực vật có thể được tạo ra bởi các bước:

tạo ra vi sinh vật tái tổ hợp, để biểu hiện gen mã hóa và thu canh trường nuôi cấy vi sinh vật tái tổ hợp biểu hiện VdAL; và

phá vỡ các vi sinh vật trong canh trường nuôi cấy để thu được tác nhân sinh học.

Để giải quyết vấn đề kỹ thuật trên, sáng chế đưa ra việc sử dụng sản phẩm điều hòa tính kháng bệnh của thực vật.

Trong việc sử dụng trên, thực vật là thực vật hai lá mầm và/hoặc thực vật một lá mầm. Thực vật hai lá mầm có thể là thực vật chi *Gospiums*. Thực vật chi *Gospiums* có thể là cây bông. Cây bông cụ thể là giống sGK9708-41.

Trong sáng chế này, bệnh héo *Verticillium* gây ra bởi chủng V₉₉₁.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 cho thấy chỉ số bệnh héo *Verticillium* ở một số dòng bông biến đổi gen chứa VdAL, trong đó WT, FCK, và RCK tương ứng với giống sGK9708-41, SCRC28, và GK44;

Fig. 2 cho thấy số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây ở một số dòng bông biến đổi gen chứa VdAL, trong đó WT, YCK, và RCK tương ứng với sGK9708-41, SCRC28, và GK44;

Fig. 3 cho thấy khả năng kháng lại bệnh héo *Verticillium* ở *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen chứa VdAL, trong đó A đại diện cho *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, của thể hệ T₃; B đại diện cho mức độ phiên mã của gen VdAL ở dòng *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, của thể hệ T₃ được xác định bằng phương pháp PCR bán định lượng; C chỉ thị cho tình trạng tăng trưởng của dòng *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, của thể hệ T₃ sau khi cấy truyền của giống bông *Verticillium dahlia*; và D cho thấy chỉ số bệnh của dòng *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, của thể hệ T₃;

Fig. 4 cho thấy sự phát hiện bằng phương pháp western blot của protein VdAL được biểu hiện ở *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, của thể hệ T₃; và

Fig. 5 cho thấy kết quả dò bằng phương pháp western blot của gen VdAL ở dòng bông biến đổi gen P1-89, chứa VdAL.

Mô tả chi tiết sáng chế các phương án của sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với việc tham khảo các ví dụ cụ thể, các ví dụ này được đưa ra chỉ để minh họa cho sáng chế, mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các phương pháp thực nghiệm được chỉ ra trong các ví dụ sau đây là các phương pháp thông thường, trừ khi được quy định khác.

Vật liệu, thuốc thử, và các chất tương tự được sử dụng trong các ví dụ sau đây đều có sẵn trên thị trường, trừ khi được quy định khác.

Verticillium dahlia trong các ví dụ sau đây là đề cập đến chủng V₉₉₁ (Qi Junsheng & Li Huaifang, “A New Detection Method of Wilting Induction by Phytotoxin from *V. dahliae* on Cotton through Leaf Pricking and Spreading,” *Cotton Science*, 2016, 18 (4): 228-232), mà có thể thu được từ trường Đại học nông nghiệp Trung Quốc (tức là người nộp đơn). Vật liệu sinh học ở đây có thể được dùng cho mục đích lặp lại các thí nghiệm của sáng chế mà không được sử dụng cho mục đích khác.

GK44 được sử dụng trong các thí nghiệm sau đây là một sản phẩm của Shandong Jinqiu Seed Industry Co., Ltd.

SCRC28 được sử dụng trong các thí nghiệm sau đây là một sản phẩm của Shandong Nongxing Seed Industry Co., Ltd.

sGK9708-41 được sử dụng trong các thí nghiệm sau đây là một sản phẩm của Xinjiang Cotton-Seed Industry Co., Ltd.

Arabidopsis thaliana Col được sử dụng trong các thí nghiệm sau đây là một sản phẩm của Salk Institute for Biological Studies.

Vector pSPT01 được sử dụng trong các thí nghiệm sau đây là pSPT01 trong Ví dụ 1 của sáng chế Trung Quốc số đơn 201010521702,6 (được công bố trên CN 101962658 A). pSPT01 được xây dựng trên cơ sở pCambia1300, trong đó chất hoạt hóa của gen đích là một siêu chất hoạt hóa với trình tự Flag ở trước chất hoạt hóa, và gen chỉ thị được thay thế bằng gen *tfdA*.

Vector pCAMBIA1300-Super được sử dụng trong các ví dụ sau đây là vector trong Ví dụ 1 của sáng chế Trung Quốc số đơn 201010521702,6 (được công bố trên CN 101962658 A). pCAMBIA1300-Super là vector thu được sau khi chất hoạt hóa CaMV35S của pCAMBIA1300 (No.: FJ362601,1 trong Ngân hàng gen) được thay thế bởi một chất hoạt hóa siêu mạnh, và điểm cắt của enzym giới hạn bị biến đổi.

Agrobacterium tumefaciens GV3101 được sử dụng trong các ví dụ sau đây là sản phẩm của Beijing Jiuzhou Tian Rui Technology Co., Ltd.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Trong ví dụ này, đã chứng minh được rằng protein VdAL có liên quan đến tính kháng bệnh có thể tăng cường tính kháng bệnh của cây bông.

I. Thiết kế cây ngô biến đổi gen chứa VdAL

Quy trình 1: Thiết kế vector tái tổ hợp và chủng tái tổ hợp

Phân tử ADN có trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự, cụ thể là gen VdAL mã hóa cho protein liên quan đến tính kháng bệnh được tổng hợp nhân tạo. Một trình tự chuỗi giữa vị trí nhận biết của *Sal* I và *Kpn* I của vector pSPT01 được thay thế bởi phân tử ADN có trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự (cụ thể là gen VdAL mã hóa cho protein liên quan đến tính kháng bệnh), và các trình tự khác của pSPT01 vẫn giữ nguyên không đổi, để thu được vector tái tổ hợp tên là pSPT01-VdAL. Vector tái tổ hợp pSPT01-VdAL biểu hiện ra protein VdAL có liên quan đến tính kháng bệnh có trình tự như SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự.

SEQ ID NO: 2 bao gồm 864 nucleotit, mã hóa cho chuỗi axit amin như SEQ ID NO: 1. Đoạn nucleotit từ 793-864 của SEQ ID NO: 2 mã hóa cho FLAG có trình tự axit amin như đoạn từ 265-287 của SEQ ID NO: 1; và đoạn nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 mã hóa cho protein có trình tự axit amin như đoạn từ 1-264 của SEQ ID NO: 1.

pSPT01-VdAL được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, để thu được chủng tái tổ hợp, tên là A-pSPT01-VdAL.

pSPT01 được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, để thu được chủng tái tổ hợp với vector rỗng, và chủng thu được đặt tên là A-pSPT01.

Quy trình 2. Thiết kế cây bông biến đổi gen chứa protein VdAL liên quan đến tính kháng bệnh

Trong bước (1), A-pSPT01-VdAL trong thao tác 1 được trải trên môi trường rắn YEB có chứa kanamycin với nồng độ cuối 50 µg/mL và rifampicin với nồng độ cuối 50 µg/mL, hoạt hóa và nuôi cấy trong 48 h ở 28 °C, để thu được các khuẩn lạc đơn.

Trong bước (2), một khuẩn lạc đơn thu được ở bước (1) được chọn lọc và cấy truyền sang 5 mL môi trường lỏng YEB chứa kanamycin với nồng độ cuối 50 µg/mL

và rifampicin với nồng độ cuối 50 µg/mL, được nuôi lắc trong 12 h ở 28 °C, để thu được dung dịch vi khuẩn.

Trong bước (3), 2 mL dung dịch vi khuẩn thu được ở bước (2) được cấy truyền sang 500 mL môi trường lỏng YEB chứa kanamycin với nồng độ cuối 50 µg/mL và rifampicin với nồng độ cuối 50 µg/mL, nuôi lắc ở 28 °C, và nuôi cấy cho đến khi $OD_{600} = 0,8-1,0$, để thu được dung dịch vi khuẩn.

Trong bước (4), dung dịch vi khuẩn thu được ở bước (3) được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, để thu được phần kết tủa vi khuẩn.

Trong bước (5), kết tủa vi khuẩn trong bước (4) được hòa tan lại vào 200 mL dung dịch 1/2 MS, trong đó 15 µL Silwet-77 đã được thêm vào, sau khi được pha trộn đồng nhất, để tạo thành dung dịch gây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens*.

Trong bước (6), nụ hoa của giống bông sGK9708-41 (dòng nhạy cảm với 2,4-D) được phân lập bằng cách đóng gói. Dung dịch gây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* ở bước (5) được phun vào các nụ hoa đã đóng gói vào ngày hôm sau trong khoảng từ 8 đến 9 giờ. Các nụ hoa được phun dung dịch gây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* sau đó được đóng gói để tránh ánh sáng, và các nụ hoa đã biến nạp được đánh dấu bằng sợi dây đỏ. Dòng này sau đó gọi là thế hệ T_0 của dòng biến đổi gen. Dòng biến đổi gen này được nhân lên đến thế hệ T_4 (bằng tự nhân giống ở mỗi thế hệ). Mỗi thế hệ được chọn lọc với 2,4-D, để thu được các dòng bông biến đổi gen thế hệ T_4 như sau: P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, P1-134, P1-143, P1-109, P1-105, P1-76, P1-82, P1-136, P1-100, P1-127, P1-135, P1102, P1-80, P1-104, P1-69, P1-110, P1-125, và P1-111, chứa VdAL.

Trong bước (7), gen VdAL của dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thế hệ T_4 thu được ở bước (6) được xác định ở cấp độ gen. Giống bông sGK9708-41 được sử dụng như một điểm quy chiếu kiểu đại với cặp mồi ATGCTTTCTCTCCAGACCGC và GAGATTTGCCGGCGGCGGTG. Kết quả chỉ ra rằng kết quả PCR của các dòng

bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) đều có băng mục tiêu kích thước 792 bp, chứng tỏ rằng các dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) đều mang gen VdAL.

Trong bước (8), sự biểu hiện gen VdAL ở các dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) được xác định bằng phương pháp PCR bán định lượng. Giống bông SGK9708-41 được sử dụng như một điểm quy chiếu kiểu đại với cặp mồi ATGCTTTCTCTCCAGACCGC và GAGATTTGCCGCGCGGTGT. UBQ được sử dụng như điểm quy chiếu nội bộ với cặp mồi CCCTGGCTGATTACATC và TGGTGTCAAGTGGGTTCAATG. Kết quả PCR cho thấy các sản phẩm PCR của các dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) đều chứa băng mục tiêu, chứng tỏ rằng các dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) đều biểu hiện gen VdAL.

Trong bước (9), sự biểu hiện protein VdAL ở các dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) được xác định bằng phương pháp western-blot. Giống bông SGK9708-41 được sử dụng như một điểm quy chiếu kiểu đại. Kháng thể flag (Cat. No. AB003-01A, một sản phẩm của Shanghai Nearshore Technology Co. LTD/Sinobio Biotech Co., Ltd.) được sử dụng. Protein được đánh dấu với dung dịch nhuộm màu Ponceau S, lượng chất tải của nó được điều chỉnh, để làm cho tổng lượng protein là như nhau ở các làn khác nhau. Kết quả được đưa ra trong Hình 5. Kết quả cho thấy các dòng bông biến đổi gen, chứa VdAL, thể hệ T₄ thu được ở bước (6) đều đã biểu hiện protein VdAL.

A-pSPT01-VdAL được thay thế bằng A-pSPT01 từ bước (1) đến bước (6), trong khi quy trình vẫn không đổi. Cây bông biến đổi gen chứa vector rỗng được thu lại và đặt tên là dòng bông biến đổi gen chứa vector rỗng.

II. Xác định khả năng kháng bệnh của cây bông biến đổi gen chứa VdAL

Bông biến đổi gen chứa VdAL được gây nhiễm với *Verticillium dahliae*, và tính kháng bệnh của cây sau gây nhiễm được đánh giá theo chỉ số bệnh héo *Verticillium* và số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của nó. Thí nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi lần bao gồm các bước cụ thể như sau.

Bông *Verticillium dahliae* được cấy truyền vào một vườn ươm bệnh trong một cánh đồng ở tỉnh Sơn Đông, để thu được vườn ươm bệnh được phân bố một cách đồng nhất với chủng V₉₉₁. Các dòng bông biến đổi gen P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, P1-134, P1-143, P1-109, P1-76, P1-82, P1-136, P1-100, P1-127, P1-135, P1-102, P1-80, P1-104, P1-69, P1-110, và P1-111, chứa VdAL, và bông biến đổi gen chứa vector rỗng thu được ở trên, giống bông sGK9708-41, giống bông kháng bệnh héo *Verticillium* GK44, và giống bông năng suất cao SCRC28 được trồng trong vườn ươm bệnh trên, tương ứng, 30 cây mỗi dòng.

Sự tác động vào cây bông được phân loại như sau trong giai đoạn hình thành hoa và quả nang của nó, và chỉ số bệnh héo *Verticillium* và hiệu quả kiểm soát tương đối của bông cũng được tính toán (xem Bảng 2 và Hình 1):

Mức 0: không có lá bị bệnh;

Mức I: 0,1% -25% lá bị bệnh;

Mức II: 25% (không bao gồm) -50% lá bị bệnh;

Mức III: 50% (không bao gồm)-75% lá bị bệnh; và

Mức IV: hơn 75% lá bị bệnh.

Chỉ số bệnh = $(1 \times \text{Số cây ở Mức I} + 2 \times \text{Số cây ở Mức II} + 3 \times \text{Số cây ở Mức III} + 4 \times \text{Số cây ở Mức IV}) / (4 \times \text{tổng số cây được điều tra}) \times 100$.

Hiệu quả kiểm soát tương đối (%) = $(\text{chỉ số bệnh của sGK9708-41} - \text{chỉ số bệnh của bông biến đổi gen chứa VdAL}) / \text{chỉ số bệnh của sGK9708-41} \times 100\%$ (hiệu quả kiểm soát tương đối của sGK9708-41 được định nghĩa là bằng 0).

Số lượng quả nang hình thành trên mỗi cá thể cây được đếm vào cuối giai đoạn tạo quả nang. Kết quả được chỉ ra trong Bảng 3 và Hình 2.

Bảng 2. Chỉ số bệnh héo Verticillium và hiệu quả kiểm soát tương đối của bông biến đổi gen chứa VdAL

Dòng /Giống	Chỉ số bệnh héo Verticillium	Hiệu quả kiểm soát tương đối (%)
P1-89	2,78±1,00	93
P1-96	5,00±0,58	88
P1-117	5,68±0,58	86
P1-90	6,58±1,41	84
P1-84	6,82±0,50	83
P1-134	7,14±3,00	83
P1-143	9,09±1,00	78
P1-109	11,36±1,29	73
P1-76	12,50±1,05	70
P1-82	13,16±2,50	68
P1-136	13,64±2,16	67
P1-100	13,64±0,50	67
P1-127	16,30±2,06	61
P1-135	17,71±1,71	58
P1-102	18,06±1,26	57

P1-80	20,26±2,45	51
P1-104	22,83±4,24	45
P1-69	29,41±0,00	30
P1-110	27,63±0,96	34
P1-111	26,67±1,50	36
Bông biến đổi gen chứa vector rỗng	43,78±2,54	-4
sGK9708-41	42,19±0,95	0
GK44	7,61±0,71	82
SCRC28	43,36±1,04	-3

Kết quả cho thấy giống bông sGK9708-41 không có sự khác biệt với bông biến đổi gen mang vector rỗng về chỉ số héo *Verticillium*. Chỉ số héo *Verticillium* của các dòng bông biến đổi gen chứa VdAL đều thấp hơn chỉ số héo *Verticillium* của giống bông kiểu dại sGK9708-41, và thấp hơn so với giống bông năng suất cao SCRC28. Chỉ số héo *Verticillium* của một số dòng (chẳng hạn như P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, và P1-134) đều thấp hơn chỉ số héo của giống bông kháng bệnh héo *Verticillium* GK44. Hiệu quả kiểm soát tương đối của giống bông sGK9708-41 không có khác biệt đáng kể với hiệu quả kiểm soát tương đối của bông biến đổi gen mang vector rỗng. Hiệu quả kiểm soát tương đối của các dòng bông biến đổi gen chứa VdAL đều cao hơn hiệu quả kiểm soát tương đối của giống bông kiểu dại sGK9708-41, và cũng cao hơn của giống bông năng suất cao SCRC28. Hiệu quả kiểm soát tương đối của một số dòng (chẳng hạn như P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, và P1-134) đều đạt trên 80%, thậm chí còn cao hơn hiệu quả kiểm soát tương đối của giống bông kháng bệnh héo *Verticillium* GK44.

Kết quả cho thấy VdAL của sáng chế này có thể tăng cường khả năng kháng bệnh héo Verticillium ở thực vật.

Bảng 3 Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây bông biến đổi gen chứa VdAL

Dòng /Giống	Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây	Quan hệ cấp số nhân với sGK9708-41
P1-89	10,3±1,91	2,71
P1-96	12,5±1,00	2,55
P1-117	12,2±1,21	2,49
P1-90	9,4±1,32	1,92
P1-84	8,9±1,10	1,82
P1-134	6,7±0,89	1,37
P1-143	10,2±0,78	2,08
P1-109	9,3±1,12	1,90
P1-105	10,7±0,99	2,18
P1-76	11,5±1,13	2,35
P1-82	12,1±0,57	2,47
P1-136	8,8±1,31	1,80
P1-100	13,1±1,16	2,67
P1-127	12,2±1,30	2,49
P1-135	9,1±2,00	1,86
P1-102	11,9±0,30	2,43

P1-80	12,5±1,23	2,55
P1-104	13,3±0,95	2,71
P1-69	12,1±1,41	2,47
P1-110	10,9±0,59	2,22
P1-111	10±1,11	2,04
Bông biến đổi gen chứa vector rỗng	4,1±1,18	0,84
sGK9708-41	4,9±0,78	-
GK44	11,5±1,43	-
SCRC28	8,0±1,90	-

Lưu ý: “-” cho thấy không có phép so sánh được thực hiện.

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây giữa giống bông sGK9708-41 và bông biến đổi gen chứa vector rỗng. Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của các dòng bông biến đổi gen chứa VdAL đều cao hơn số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của giống bông kiểu đại sGK9708-41. Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của các dòng bông biến đổi gen P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, P1-134, P1-143, P1-109, P1-105, P1-76, P1-82, P1-136, P1-100, P1-127, P1-135, P1-102, P1-80, P1-104, P1-69, P1-110, và P1-111, chứa VdAL, cũng đều cao hơn số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của giống bông năng suất cao SCRC28. Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của một số dòng (such as P1-96, P1-117, P1-82, P1-100, P1-127, P1-102, P1-80, P1-104, và P1-69) đều cao hơn số lượng quả bông trên mỗi cá thể cây của giống bông kháng bệnh héo Verticillium GK44. Kết quả cho thấy VdAL trong sáng chế này có thể tăng cường khả năng kháng bệnh héo Verticillium và giảm sự ảnh hưởng của bệnh héo Verticillium đến năng suất bông.

Ví dụ 2

Trong ví dụ này, đã chứng minh được rằng protein VdAL có liên quan đến tính kháng bệnh có thể tăng cường tính kháng bệnh của *Arabidopsis thaliana*.

I. Thiết kế *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen chứa VdAL

Quy trình 1. Thiết kế vector tái tổ hợp và chủng tái tổ hợp

Phân tử ADN có trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự, cụ thể là gen VdAL mã hóa cho protein liên quan đến tính kháng bệnh được tổng hợp nhân tạo. Một trình tự chuỗi giữa vị trí nhận biết của *Pst* I và *Kpn* I của vector pCAMBIA1300-Super được thay thế bởi phân tử ADN có trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 trong Danh mục trình tự (cụ thể là gen VdAL liên quan đến tính kháng bệnh), và các trình tự khác của pCAMBIA1300-Super vẫn giữ nguyên không đổi, để thu được vector tái tổ hợp tên là pCAMBIA1300-Super-VdAL. Vector tái tổ hợp pCAMBIA1300-Super-VdAL biểu hiện ra protein VdAL có trình tự như SEQ ID NO: 1 trong Danh mục trình tự.

SEQ ID NO: 2 bao gồm 864 nucleotit, mã hóa cho chuỗi axit amin như SEQ ID NO: 1. Đoạn nucleotit từ 793-864 của SEQ ID NO: 2 mã hóa cho FLAG có trình tự axit amin như đoạn từ 265-287 của SEQ ID NO: 1; và đoạn nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2 mã hóa cho protein có trình tự axit amin như đoạn từ 1-264 của SEQ ID NO: 1.

pCAMBIA1300-Super-VdAL được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, để thu được chủng tái tổ hợp, tên là A-pCAMBIA1287-Super-VdAL.

pCAMBIA1300-Super được đưa vào *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, để thu được chủng tái tổ hợp với vector rỗng, và chủng thu được đặt tên là A-pCAMBIA1300-Super.

Quy trình 2. Thiết kế *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen chứa gen VdAL liên quan đến tính kháng bệnh

Trong bước (1), chủng tái tổ hợp A-pCAMBIA1300-Super-VdAL trong thao tác 1 được trải trên môi trường rắn YEB có chứa kanamycin với nồng độ cuối 50 µg/mL và rifampicin với nồng độ cuối 50 µg/mL, hoạt hóa và nuôi cấy trong 48 h ở 28 °C, để thu được các khuẩn lạc đơn.

Trong bước (2), một khuẩn lạc đơn thu được ở bước (1) được chọn lọc và cấy truyền sang 5 mL môi trường lỏng YEB chứa kanamycin với nồng độ cuối 50 µg/mL và rifampicin với nồng độ cuối 50 µg/mL, được nuôi lắc trong 12 h ở 28°C, để thu được dung dịch vi khuẩn.

Trong bước (3), 2 mL dung dịch vi khuẩn thu được ở bước (2) được cấy truyền sang 500 mL môi trường lỏng YEB chứa kanamycin với nồng độ cuối 50 µg/mL và rifampicin với nồng độ cuối 50 µg/mL, nuôi lắc ở 28°C, và nuôi cấy cho đến khi $OD_{600} = 0,8-1,0$, để thu được dung dịch vi khuẩn.

Trong bước (4), dung dịch vi khuẩn thu được ở bước (3) được ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, để thu được phần kết tủa vi khuẩn.

Trong bước (5), kết tủa vi khuẩn trong bước (4) được hòa tan lại vào 200 mL dung dịch 1/2 MS, trong đó 15 µL Silwet-77 đã được thêm vào, sau khi được pha trộn đồng nhất, để tạo thành dung dịch gây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens*.

Trong bước (6), cụm hoa của *Arabidopsis thaliana* Col trong giai đoạn ra hoa được ngâm vào dung dịch gây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* thu được trong bước (5) trong 30 giây và sau đó được lấy ra và trồng ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ trong điều kiện tối, để thu được *Arabidopsis thaliana* đã gây nhiễm.

Trong bước (7), *Arabidopsis thaliana* đã gây nhiễm thu được ở bước (6) được trồng ở nhiệt độ phòng trong 24 h trong với ánh sáng yếu, sau đó trồng ở nhiệt độ

22°C trong chu kỳ sáng-tối là 16 giờ chiếu sáng /8 giờ tối. Cây như vậy là cây biến đổi gen thế hệ T_0 . Cây biến đổi gen này được nhân lên đến thế hệ T_3 (bằng tự nhân giống ở mỗi thế hệ). Mỗi thế hệ được chọn lọc với hygromyxin, để thu được *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, thế hệ T_3 (xem Hình 3 - A)

Trong bước (8), gen VdAL của *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, thế hệ T_3 thu được trong bước (7) được xác định ở cấp độ gen. was identified at a genomic level. *Arabidopsis thaliana* Col được sử dụng như một điểm quy chiếu kiểu đại với cặp mồi ATGCTTTCTCTCCAGACCGCAGC và TAGCGCAGTTACGATCAGGGTCG. Kết quả chỉ ra rằng kết quả PCR của các dòng 2 và 3 đều có băng mục tiêu kích thước 403 bp, chứng tỏ rằng các dòng 2 và 3 đều mang gen VdAL.

Trong bước (9), sự biểu hiện gen VdAL ở *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, thế hệ T_3 thu được trong bước (7) được xác định bằng phương pháp PCR bán định lượng. *Arabidopsis thaliana* Col được sử dụng như một điểm quy chiếu kiểu đại với cặp mồi GCAACATCACCCCTTCGTACT và CAGACTGGTTGCCGAAGAA. UBI được sử dụng như điểm quy chiếu nội bộ với cặp mồi CCCTGGCTGATTACATC và TGGTGTCTAGTGGGTTCAATG (xem Hình 3 - B). Kết quả chỉ ra rằng kết quả PCR của các dòng 2 và 3 đều chứa băng mục tiêu, chứng tỏ dòng 2 và 3 đều biểu hiện gen VdAL.

Trong bước (10), sự biểu hiện protein VdAL ở *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 và 3, chứa VdAL, thế hệ T_3 thu được trong bước (7) được xác định bằng phương pháp western-blot. *Arabidopsis thaliana* Col được sử dụng như một điểm quy chiếu kiểu đại. Kháng thể flag (Cat. No. AB003-01A, một sản phẩm của Shanghai Nearshore Technology Co. LTD/Sinobio Biotech Co., Ltd.) được sử dụng. Protein được đánh dấu với dung dịch nhuộm màu Ponceau S, lượng chất tải của nó được điều chỉnh, để làm cho tổng lượng protein là như nhau ở các làn khác nhau. Kết

quả được đưa ra trong Hình 4. Kết quả cho thấy các dòng 2 và 3 đều đã biểu hiện protein VdAL.

A-pCAMBIA1300-Super-VdAL được thay thế bằng A-pCAMBIA1300-Super từ bước (1) đến bước (7), trong khi quy trình vẫn không đổi. *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen với vector rỗng được thu lại và đặt tên là *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen mang vector rỗng.

II. Xác định tính kháng bệnh của *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen chứa VdAL

Arabidopsis thaliana biến đổi gen chứa VdAL được gây nhiễm với *Verticillium dahliae*, và tính kháng bệnh của cây được xác định bằng chỉ số bệnh héo *Verticillium* của cây. Thí nghiệm được lặp lại ba lần, mỗi lần bao gồm các bước cụ thể như sau.

Bào tử *Verticillium dahliae* được tạo huyền phù trong nước cất vô trùng, để thu được dịch huyền phù bào tử có nồng độ 1×10^6 cfu/mL. *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 2 chứa VdAL thu được ở bước (1) được ngâm trong dịch huyền phù bào tử trong 30 giây và sau đó trồng ở 22 °C với chu kỳ sáng-tối là 16 giờ chiếu sáng/8 giờ tối trong 21 ngày để thu được tổng cộng 30 cây của dòng 2 đã được xử lý.

Arabidopsis thaliana biến đổi gen dòng 2 chứa VdAL ở bước (1) được thay thế tương ứng bằng *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 3 chứa VdAL ở bước (1), Col, và *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen mang vector rỗng thu được ở bước (1), và các bước khác không đổi để thu được *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen dòng 3 chứa VdAL được xử lý.

Arabidopsis thaliana biến đổi gen dòng 2 chứa VdAL ở bước (1) được thay thế bằng Col, một dòng kiểm soát không biến đổi gen, và dịch huyền phù bào tử được thay bằng nước cất, các bước khác không đổi để thu được dòng kiểm soát Col ngâm trong nước.

Chỉ số bệnh (xem Hình 3 - C và D) của dòng 2 đã xử lý, dòng 3 đã xử lý, Col đã xử lý, *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen mang vector rỗng, và dòng kiểm soát Col ngâm trong nước được tính theo các tiêu chí sau đây:

Mức 0: không có lá bị bệnh;

Mức I: 0,1% -25% lá bị bệnh;

Mức II: 25% (không bao gồm) -50% lá bị bệnh;

Mức III: 50% (không bao gồm)-75% lá bị bệnh; và

Mức IV: hơn 75% lá bị bệnh.

Chỉ số bệnh được tính theo công thức: chỉ số bệnh = $[\sum \text{mức bệnh} \times \text{số cây} / (\text{tổng số cây} \times \text{mức bệnh cao nhất})] \times 100$.

Kết quả cho thấy không có khác biệt đáng kể về chỉ số bệnh giữa Col và *Arabidopsis thaliana* biến đổi gen mang vector rỗng. Chỉ số bệnh của Col là $95 \pm 2,6$; chỉ số bệnh của dòng 2 là $76 \pm 1,6$, 80% so với Col; chỉ số bệnh của dòng 3 là $74 \pm 5,4$, 78% so với Col; và chỉ số bệnh của dòng kiểm soát Col ngâm trong nước là 0. Chỉ số bệnh của dòng 2 và dòng 3 đều thấp hơn so với chỉ số bệnh của Col. Kết quả cho thấy VdAL có thể tăng cường khả năng kháng bệnh héo Verticillium ở thực vật.

Khả năng áp dụng trong công nghiệp

Các thí nghiệm chỉ ra rằng VdAL (protein liên quan đến tính kháng bệnh) và gen mã hóa của nó có thể tăng cường khả năng kháng bệnh của thực vật với bệnh héo Verticillium. Chỉ số bệnh héo Verticillium của các dòng bông biến đổi gen chứa VdAL đều thấp hơn chỉ số bệnh của giống bông kiểu đại SGK9708-41, và thấp hơn cả chỉ số bệnh của giống năng suất cao SCRC28. Chỉ số bệnh héo Verticillium của các dòng biến đổi gen P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, và P1-134, chứa VdAL, đều thấp hơn chỉ số bệnh của giống kháng bệnh GK44. Hiệu quả kiểm soát tương đối của các dòng bông biến đổi gen chứa VdAL đều cao hơn hiệu quả kiểm soát tương đối của giống bông kiểu đại SGK9708-41, và cũng cao hơn hiệu quả kiểm soát tương

đối của giống năng suất cao SCRC28. Hiệu quả kiểm soát tương đối của các dòng bông biến đổi gen P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, và P1-134, chứa VdAL, đều đạt trên 80%, thậm chí cao hơn hiệu quả kiểm soát tương đối của giống kháng bệnh GK44.

VdAL (protein liên quan đến tính kháng bệnh) và gen mã hóa trong sáng chế của nó có thể tăng cường khả năng của thực vật chống lại bệnh héo Verticillium, và giảm tác động của bệnh héo Verticillium đến năng suất bông. Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của các giống bông biến đổi gen chứa VdAL đều cao hơn giống bông kiểu đại SGK9708-41. Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của các dòng bông biến đổi gen P1-89, P1-96, P1-117, P1-90, P1-84, P1-134, P1-143, P1-109, P1-105, P1-76, P1-82, P1-136, P1-100, P1-127, P1-135, P1-102, P1-80, P1-104, P1-69, P1-110, và P1-111, chứa VdAL, cũng đều cao hơn số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của giống bông năng suất cao SCRC28. Số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của các dòng bông biến đổi gen P1-96, P1-117, P1-82, P1-100, P1-127, P1-102, P1-80, P1-104, và P1-69 chứa VdAL thậm chí đều cao hơn số lượng quả nang trên mỗi cá thể cây của giống bông kháng bệnh GK44.

Các thí nghiệm chỉ ra rằng VdAL (protein liên quan đến tính kháng bệnh) và gen mã hóa của nó trong sáng chế này có thể được sử dụng để tăng cường tính kháng bệnh ở thực vật.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein a) hoặc c) như sau:
 - a) protein có trình tự axit amin là trình tự axit amin từ 1-264 của SEQ ID NO: 1;
 - c) protein với trình tự chuỗi axit amin như SEQ ID NO: 1.
2. Vật liệu sinh học liên quan đến protein theo điểm 1, trong đó vật liệu sinh học được chọn từ một trong nhóm bao gồm từ B1) đến B8) như sau:
 - B1) phân tử axit nucleic mã hóa cho protein theo điểm 1;
 - B2) cát-xét biểu hiện gen chứa phân tử axit nucleic B1);
 - B3) vector tái tổ hợp chứa phân tử axit nucleic B1);
 - B4) vector tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện B2);
 - B5) vi sinh vật tái tổ hợp chứa axit nucleic B1);
 - B6) vi sinh vật tái tổ hợp chứa cát-xét biểu hiện B2);
 - B7) vi sinh vật tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp B3);
 - B8) vi sinh vật tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp B4).
3. Vật liệu sinh học theo điểm 2, trong đó axit nucleic B1) là gen đại diện bởi:
 - 1) phân tử ADN có trình tự nucleotit như đoạn nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2; hoặc
 - 2) phân tử ADN với trình tự chuỗi nucleotit như SEQ ID NO: 2.
4. Phương pháp tạo ra thực vật biến đổi gen có khả năng kháng bệnh, bao gồm bước đưa gen mã hóa protein theo điểm 1 vào một cây nhận, để thu được cây biến đổi gen kháng bệnh mà khả năng kháng bệnh mạnh hơn sơ với cây nhận gen; trong đó khả năng kháng bệnh là kháng bệnh héo Verticillium.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó gen mã hóa protein theo điểm 1 là một phân tử ADN có trình tự chuỗi mã hóa là trình tự nucleotit từ 1-792 của SEQ ID NO: 2.
6. Phương pháp theo điểm 4 hoặc 5, trong đó thực vật là thực vật hai lá mầm và/hoặc thực vật một lá mầm.

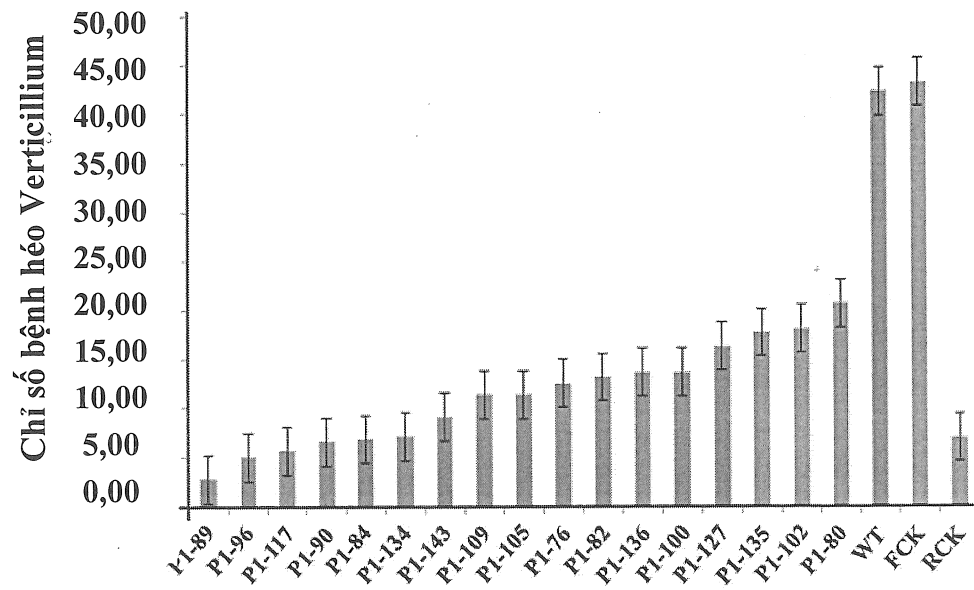


Fig. 1

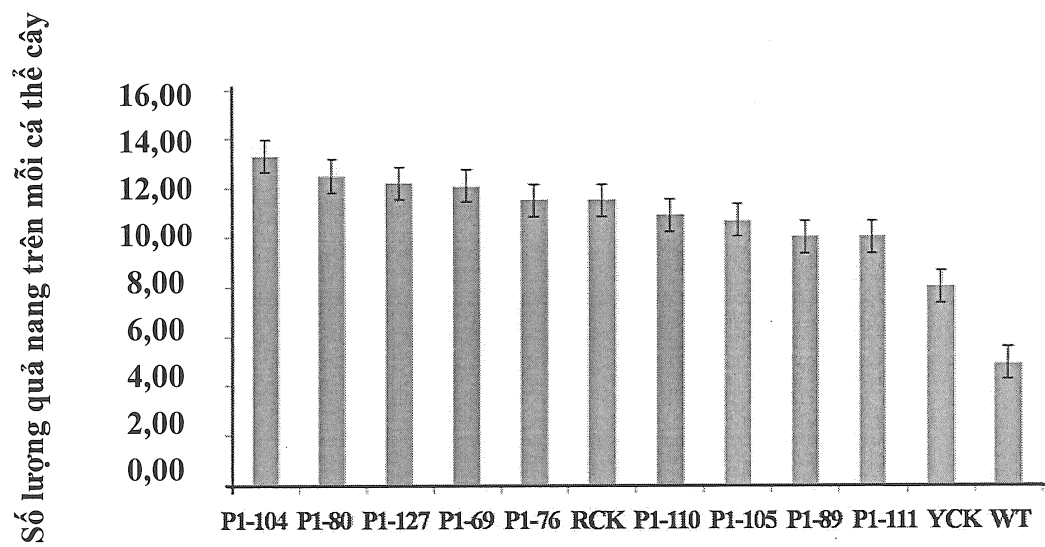


Fig. 2

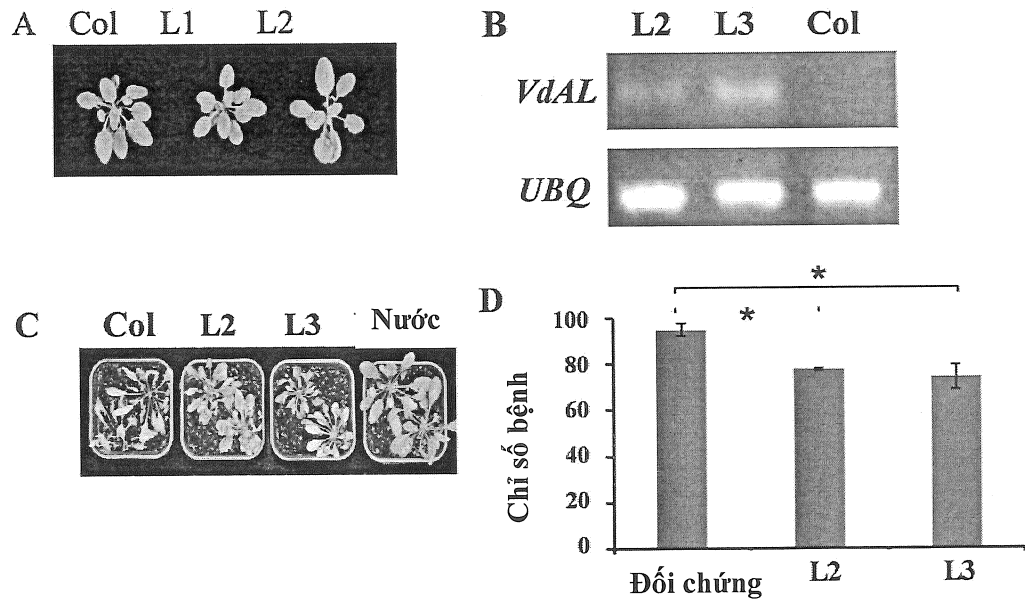


Fig. 3

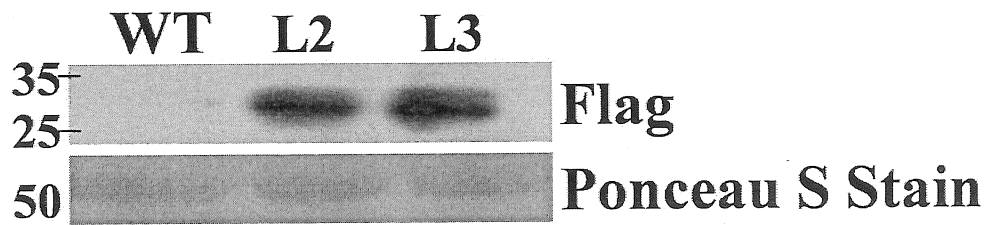


Fig. 4

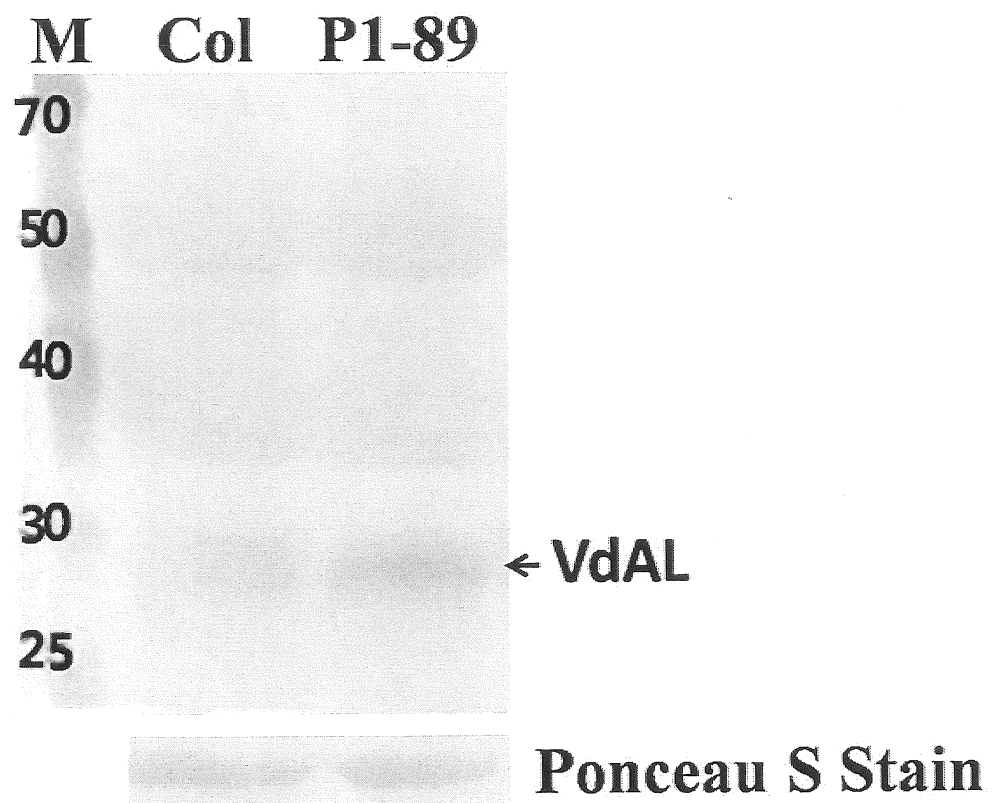


Fig. 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> China Agricultural University

<120> Protein liên quan đến tính kháng bệnh và gen mã hóa của nó, sản phẩm để điều tiết tính kháng bệnh của thực vật và phương pháp tạo ra thực vật biến đổi gen có khả năng kháng bệnh

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 287

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223>

<400> 1

```

Met Leu Ser Leu Gln Thr Ala Ala Leu Leu Phe Pro Leu Val Ala
1      5      10      15
Ala Ser Pro Val Ala Arg Ala Ala Glu Thr Ser Val Thr Val Thr Val
20      25      30
Asp Thr Ala Pro Ala Gly Pro Thr Ser Ser Thr Tyr Asn Trp Ala Glu
35      40      45
Gly Trp Lys Ala Asn Phe Pro Ile His Gln Ser Cys Asn Ile Thr Leu
50      55      60
Arg Thr Gln Leu Glu Ala Ala Leu Ala Glu Thr Met Thr Ile Ala Ala
65      70      75      80
His Ala Arg Asp His Leu Leu His Asn Pro Lys Ser Glu Leu Ala Thr
85      90      95
Lys Phe Phe Gly Asn Gln Ser Val Ala Gly Pro Ile Gly Trp Tyr Ser
100     105     110
Lys Val Val Ser Thr Asp Lys Ser Glu Met Leu Phe Arg Cys Asp Asp
115     120     125
Pro Asp Arg Asn Cys Ala Thr Gln Asp Gly Trp Ala Gly His Trp Arg
130     135     140
Gly Ser Asn Ala Thr Gln Glu Thr Val Ile Cys Asp Leu Ser Tyr Glu
145     150     155     160
Ile Arg Arg Pro Leu Ala Ala Leu Cys Gly Gly Tyr Thr Val Ala
165     170     175
Glu Ser Lys Leu Asn Thr Tyr Trp Ala Thr Gly Leu Leu His Arg Ala
180     185     190
Phe His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Gly Ile Ile Asp His Tyr Ala Glu
195     200     205
Asp Tyr Ala Glu Ala Leu Lys Leu Ala Ala Thr Glu Pro Glu Leu Ser
210     215     220
Ile Ile Asp Ser Asp Thr Leu Gln Tyr Phe Ala Ile Glu Ala Tyr Ala
225     230     235     240
Tyr Asp Ile Ala Ile Pro Gly Val Gly Cys Pro Gly Glu Ser Pro Ser
245     250     255
Leu Thr Pro Pro Ala Asn Leu Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly
260     265     270
Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
275     280     285

```

<210> 2

<211> 864

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223>

<400> 2

```

atgctttctc tccagaccgc agccctgctg ctcttccctc tcgtcgctgc ctctcccgtg      60
gcacgcgctg ctgagaccag tggtaccgtc acggttgaca ctgcccctgc cggccctacc      120
agctccacct acaactgggc cgaaggctgg aaggccaact tccccatcca ccagtcttgc      180
aacatcacc ttcgtactca gctcgaggct gctctcgccg agaccatgac cattgcggcc      240
cacgccgcg atcatcttct ccacaacccc aagtccgagc tggcgacgaa gttcttcggc      300
aaccagtctg tcgcccggcc catcggtcgg tactccaagg tcgtctcgac cgacaagtct      360
gagatgctct tccgctgcga cgaccctgat cgtaactgcg ctaccaaga tggctgggcc      420
ggccactggc gcggctcgaa tgccaccag gagacggtca tctgcgacct ctctacgag      480

```

LHC1760337PVN.170726.Sequence Listing.txt

atccgccgcc	ctcttgccgc	tctctgcggt	ggtggttata	ccgtggccga	gtccaagctc	540
aacacctact	gggccactgg	ccttctgcac	cgcgccttcc	acctgcccgg	catcagcgac	600
ggcatcatcg	atcactacgc	tgaggattac	gccgaggccc	tcaagcttgc	cgccactgag	660
cctgaactct	ccatcatcga	cagcgacacc	cttcagtact	tcgccattga	ggcttatgcc	720
tatgacattg	ccatccccgg	cgtcggctgc	cccggcgaga	gcccatcatt	gacaccgccg	780
ccggcaaadc	tcatggacta	caaagaccat	gatggagact	ataaggatca	cgacatcgat	840
tacaaggacg	atgacgataa	gtaa				864