



(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)



1-0030380

(51)⁷ C12N 15/82; A01H 5/00

(13) B

(21) 1-2015-02231

(22) 20/11/2014

(86) PCT/US2014/066599 20/11/2014

(87) WO2015/077447 A2 28/05/2015

(30) 61/907,617 22/11/2013 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 25/08/2016 341A

(73) BANGLADESH JUTE RESEARCH INSTITUTE (BD)

Manik Mia Avenue, Dhaka, 1207 Bangladesh

(72) ISLAM, Mohammed, Shahidul (BD); AHMED, Borhan (BD); HAQUE, Mohammed, Samiul (BD); ALAM, Mohammed, Monjurul (BD).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA CHO POLYPEPTIT HOMEBOX 4 LIÊN QUAN ĐẾN WUSCHEL (WOX4) VÀ CÓ NGUỒN GỐC TỪ HAI LOÀI CÂY CORCHORUS OLITORIUS VÀ CORCHORUS CAPSULARIS, CẤU TRÚC GEN TÁI TỔ HỢP, THỂ BIẾN NẠP VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN CÓ NĂNG SUẤT SỢI ĐƯỢC TĂNG CƯỜNG

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL từ hai loài cây đay, cụ thể là, *Corchorus olitorius* ("*C. olitorius*") và *Corchorus capsularis* ("*C. capsularis*"), và polypeptit tương ứng có nguồn gốc từ đó. Trình tự polynucleotit được bộc lộ mã hóa cho polypeptit homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4), mà mang hoạt tính xúc tác trong việc làm tăng sự sản xuất sợi ở cây đay. Sáng chế cũng đề cập đến cây trồng có sự biểu hiện được cải biến của axit nucleic mã hóa cho polypeptit WOX 4, mà có năng suất sợi được tăng cường đối với cây trồng kiểu đại tương ứng hoặc cây trồng đối chứng khác. Vật truyền, cấu trúc biểu hiện và tế bào chủ bao gồm và/hoặc có chứa các trình tự nucleotit của protein cũng được đề xuất. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp sản xuất protein và phương pháp cải biến protein để cải thiện các đặc tính mong muốn của chúng. Protein theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều cách khác nhau, bao gồm làm cảm ứng, làm khởi đầu, cải thiện, hoặc làm tăng sự sinh trưởng cây, chiều cao cây, năng suất sợi và hạt.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến lĩnh vực sinh học phân tử và đề cập đến phương pháp làm tăng cường tính trạng liên quan đến năng suất sợi bằng cách điều biến sự biểu hiện ở cây trồng của axit nucleic mã hóa cho polypeptit protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX4). Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất thể tương đồng homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX4) được phân lập từ hai loài cây đay, cụ thể là, *C. olitorius* và *C. capsularis*, và ứng dụng của nó trong việc sản xuất sợi libe ở cây đay, cũng như là cây đay chuyển gen của chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Đay là sợi tự nhiên thân thiện với môi trường và có khả năng thoái biến sinh học. Nó là nguồn có thể tái chế được với khả năng sản xuất sinh khối cao trên mỗi đơn vị diện tích đất. Hơn 100 loài đay (bao gồm cây hoang dại) sản xuất sợi libe tự nhiên. Đay được sản xuất từ cây trồng thuộc giống *Corchorus*, mà trước đây được phân loại vào họ Tiliaceae, gần đây là họ Malvaceae. Tuy nhiên, chỉ hai trong số các loài này, *C. olitorius* và *C. capsularis*, sản xuất sợi chất lượng cao thích hợp để sử dụng cho mục đích công nghiệp. Vì là sợi tự nhiên, đay có thể được sử dụng theo nhiều cách, tổng hợp bổ sung hoặc thay thế, và nó ngày càng được quan tâm trong ngành công nghiệp. Vì nhu cầu ngày càng tăng đối với sợi đay, điều cần thiết là cải thiện thêm nữa sự sản xuất sợi đay. Do đó, người ta rất mong muốn nghiên cứu về sự sinh tổng hợp sợi và khảo sát sinh học phân tử tham gia vào sự sinh tổng hợp sợi này.

Sợi đay là sợi ngoài vách lá mà được tạo thành bởi và/hoặc có chứa hai loại sợi: (i) sợi libe sơ cấp mà phát triển từ tiền tầng sinh gỗ ở vùng libe nguyên sinh thông qua sự phân chia và sự cải biến tế bào, và (ii) sợi libe thứ cấp mà phát triển từ tầng sinh gỗ bằng sự hoạt động của khởi thủy hình thoi và tia (Maiti and Mitra, 1972. Bull Bot Soc Bengal

26:79–85). Các mô tiền tầng sinh gỗ và tầng sinh gỗ liên lạc từ tế bào này sang tế bào khác thông qua yếu tố ức chế biệt hóa thành phần có ống khí (TIDF) và protein kinaza màng thụ thể TDIF (TDR), mà thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào tiền tầng sinh gỗ và kìm hãm sự biệt hóa xylem của chúng (Figure 1; Hirakawa et al., 2010. *Plant Cell*, 22:2618-2629; Etchells et al., 2013. *Development* 140, 2224-2234).

Họ gen HOMEBOX liên quan đến WUSCHEL (WOX) thực hiện các chức năng liên quan trong quá trình khởi đầu và/hoặc duy trì các tế bào khởi đầu phôi, mô phân sinh, và cơ quan khác nhau (Haecker et al., 2004). Trong số các protein họ gen HOMEBOX liên quan đến WUSCHEL (WOX), WOX 4 đóng vai trò làm yếu tố điều hòa then chốt của con đường truyền tín hiệu TDIF (Hirakawa et al. 2010) và được biểu hiện ưu tiên ở tiền tầng sinh gỗ và tầng sinh gỗ (Schrader et al., 2004; Ji et al., 2010 và Hirakawa et al. 2010). Ví dụ, TDIF-TDR gây ra sự phiên mã của yếu tố phiên mã chính homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) mà thúc đẩy sự duy trì của tế bào mầm tiền tầng sinh gỗ/tầng sinh gỗ ở *Arabidopsis* và ở cà chua.

Polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4) xúc tác cho sự khởi đầu của sợi libe ở thực vật. Tuy nhiên, không có nhiều báo cáo đặc tính hoặc công nghệ hiện tại được nêu trong tình trạng kỹ thuật liên quan đến polypeptit này. Đơn đăng kí Sáng chế Mỹ với số công bố 2011/0283420 A1 đã bộc lộ polypeptit giống homeobox liên quan đến wuschel 1 (giống WOX1) đối với các tính trạng liên quan đến năng suất được tăng cường ở cây trồng. Trong một bằng Sáng chế châu Âu số 1451301 B1 khác đã bộc lộ việc sử dụng gen wuschel trong việc đẩy mạnh sự phát sinh phôi sinh dưỡng ở cây trồng. Gần đây, một số thể tương đồng gen wuschel được bộc lộ trong đơn đăng kí Sáng chế Mỹ số với số công bố 2010/0100981 A1.

Dựa trên thực tế rằng protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL có thể đóng vai trò quan trọng trong con đường tổng hợp sinh học của sợi dây, điều mong muốn đối với ngành công nghiệp là thực hiện nghiên cứu di truyền về sự tổng hợp sinh học của sợi ở thực vật bằng cách khảo sát và sử dụng thông tin sinh học phân tử và di truyền của homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4). Bên cạnh đó, vì con đường tổng hợp sợi và sự sai khác cấu trúc di truyền của mỗi loài thực vật thường thay đổi, nghiên cứu đặc hiệu loài cũng được ưu tiên để tối ưu hóa năng suất của sợi từ cây dây, và thu được kết quả thích hợp để có thể sử dụng trong công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế, trong số các khía cạnh khác, đề xuất gen mã hóa cho protein, có nguồn gốc từ *C. olitorius* và *C. capsularis*, mà tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành sợi libe của chúng, và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4). Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất gen mà có khả năng gây cảm ứng tạo sợi libe, do đó tạo ra protein được mã hóa bởi chúng, và việc sử dụng chúng.

Mục đích khác của sáng chế đề xuất thông tin sinh học phân tử và di truyền của homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) để được khai thác/ được sử dụng để cải thiện sự sản xuất, sự sinh trưởng, độ bền và năng suất của sợi ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis*, cũng như là ở các cây trồng sản xuất sợi libe khác.

Mục đích khác nữa của sáng chế là để thu được cây trồng chuyển gen của *C. olitorius* và *C. capsularis* có sự sản xuất sợi được làm tăng bằng cách điều biến sự tổng hợp sinh học của homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) ở cây trồng.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất polynucleotit được phân lập có các trình tự nucleotit đặc hiệu, mà có thể làm thuận tiện cho việc thực hiện của phương pháp được bộc lộ, và đề xuất phương thức tiếp cận cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis* chuyển gen.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp khả thi có tiềm năng thương mại để làm tăng sự sản xuất sợi đối với sản phẩm có nguồn gốc từ sợi đay.

Sáng chế đề xuất gen được phân lập từ *C. olitorius* mã hóa cho protein mà có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 3, mà tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành sợi libe và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4). Sáng chế còn đề xuất gen mã hóa cho protein mà có trình tự axit amin được cải biến bằng cách thêm hoặc làm khuyết một hoặc một số axit amin và/hoặc thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 3, mà tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành của sợi libe và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4). Sáng chế còn đề xuất gen mà lai hóa với axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO: 1, cụ thể là ADN của nó hoặc một phần của

nó, và mã hóa cho protein tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành của sợi libe và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4).

Sáng chế cũng đề xuất gen được phân lập từ *C. capsularis* mã hóa cho protein mà có trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6, mà tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành của sợi libe và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4). Sáng chế còn đề xuất gen mã hóa cho protein mà có trình tự axit amin được cải biến bằng cách thêm hoặc làm khuyết một hoặc một số axit amin và/hoặc thay thế bằng axit amin khác trong trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6, mà tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành của sợi libe và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4). Sáng chế còn đề xuất gen mà lai hóa với axit nucleic như nêu trong SEQ ID NO: 4, cụ thể là ADN của nó hoặc một phần của nó, và mã hóa cho protein tham gia vào việc xúc tác cho sự khởi đầu của sự tạo thành của sợi libe và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4).

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, cây *C. olitorius* được sử dụng là giống O-4, và cây *C. capsularis* được sử dụng là giống CVL-1.

Phương án khác của sáng chế bộc lộ cấu trúc gen tái tổ hợp bao gồm polypeptit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 5, trong đó polynucleotit có thể biểu hiện được ở tế bào chủ để sản xuất thể tương đồng của homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) lần lượt ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis*.

Phương án khác của sáng chế đề xuất thể biến nạp bao gồm cấu trúc gen tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 5 để sản xuất thể tương đồng của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4).

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất protein tham gia vào hoạt tính xúc tác đối với sự khởi đầu sợi libe, và có trình tự giống homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4), bao gồm bước nuôi cấy và/hoặc trồng vật chủ nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp gây cảm ứng sự khởi đầu của sợi libe của cây trồng hoặc tế bào thực vật; ngoài ra, sáng chế còn bộc lộ phương pháp bao gồm và/hoặc có chứa bước đưa gen nêu trên vào cây trồng hoặc tế bào thực vật, và làm biểu hiện gen này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng nhận ra rằng sáng chế cũng thích hợp để thực hiện các mục đích và thu được các kết quả và ưu điểm nêu, cũng như là các kết quả và ưu điểm vốn có trong bản mô tả này. Các phương án được mô tả trong bản mô tả này không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Các dấu hiệu, khía cạnh và ưu điểm này và các dấu hiệu, khía cạnh và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi tham khảo phần mô tả và yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện con đường truyền tín hiệu TDIF-TDR. Việc truyền tín hiệu TDIF-TDR phân ra thành hai con đường, một là WOX 4 tham gia vào sự tăng sinh tế bào libe, mà thúc đẩy sự khởi đầu tế bào sợi và con đường kia là yếu tố giả định X mà ức chế sự biệt hóa xylem của tế bào mầm mạch.

Fig. 2 thể hiện cây phát sinh loài so sánh SEQ ID NO: 3 từ *C. olitorius* và SEQ ID NO. 6 từ *C. capsularis* cùng với trình tự axit amin khác, mà sản xuất protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu đầy đủ hơn từ phần mô tả chi tiết dưới đây và hình vẽ kèm theo mà tạo thành một phần của bản mô tả sáng chế này.

Các định nghĩa và/hoặc phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này xác định sáng chế và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực thực hành sáng chế. Trừ khi có chỉ dẫn khác, các thuật ngữ cần được hiểu theo cách dùng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan. Ở chừng mực mà các định nghĩa và/hoặc phương pháp bất kỳ được phát hiện thấy là không thống nhất với định nghĩa và/hoặc phương pháp bất kỳ nêu trong tài liệu tham khảo sáng chế hoặc không sáng chế bất kỳ nêu trong bản mô tả này hoặc trong tài liệu tham khảo bất kỳ được tìm thấy ở nơi khác, cần hiểu rằng định nghĩa và/hoặc phương pháp mà đã được nêu /được thừa nhận rõ ràng trong bản mô tả này sẽ được áp dụng trong bản mô tả này. Các thuật ngữ số ít bao gồm cả nghĩa số nhiều trừ khi nội dung chỉ ra rõ ràng theo nghĩa khác. Tương tự, từ "hoặc" được dự định là bao gồm cả nghĩa "và" trừ khi nội dung chỉ ra rõ ràng nghĩa khác. Do đó, "bao gồm A hoặc B" có nghĩa là bao gồm A, hoặc B, hoặc A và B. Cũng cần hiểu

rằng tất cả các kích thước bazơ hoặc kích thước axit amin, và tất cả các giá trị khối lượng phân tử hoặc số khối phân tử, được nêu đối với axit nucleic hoặc polypeptit là giá trị xấp xỉ, và được nêu để mô tả. Mặc dù phương pháp và nguyên liệu tương tự hoặc tương đương với phương pháp và nguyên liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng để thực hiện hoặc thử nghiệm sáng chế này, phương pháp và nguyên liệu thích hợp được mô tả dưới đây.

Sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập mã hóa cho protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL được chiết từ *C. olitorius* và *C. capsularis*, và polypeptit tương ứng có nguồn gốc từ đó. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất thể tương đồng homeobox liên quan đến WUSCHEL 4, và ứng dụng của chúng trong việc năng suất sợi được tăng cường ở *C. olitorius* và *C. capsularis*, cả hai là loài cây đay, cũng như là cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis* chuyển gen liên quan. Trình tự hệ gen theo sáng chế mã hóa cho enzym đã được xác định chủ yếu bằng cách so sánh các trình tự nucleotit của ADN hệ gen *C. olitorius* và *C. capsularis* và các trình tự nucleotit của gen enzym đã biết của cây trồng khác. Trước sáng chế này, các trình tự nucleotit của các gen *C. olitorius* và *C. capsularis*, khung đọc mở, vị trí của exon và intron, cấu trúc của enzym, và sự hữu dụng tiềm năng của chúng trong sự phát triển của cây đay có tiềm năng năng suất sợi cao chưa được biết tới.

Phân tích trình tự hệ gen của các loài đay được trồng thương mại, *C. olitorius* và *C. capsularis*, phát hiện ra rằng cả hai loài có một gen đơn lẻ mã hóa cho enzym mà mang hoạt tính xúc tác được ưu tiên để làm tăng sự sản xuất sợi. Các trình tự nucleotit được chú thích ban đầu bằng chương trình phần mềm, chẳng hạn như Augustus, Semi-HMM-based Nucleic Acid Parser (SNAP), Geneid (Genome BioInformatics Research Lab), mà có thể xác định giả định vùng mã hóa, intron, và mối nối ghép. Sự hiệu chỉnh tự động và bằng tay khác của các trình tự nucleotit được thực hiện để cải tiến và thiết lập sự mô tả đặc điểm chính xác của vùng mã hóa và đặc tính gen khác.

Trên 30.096 cADN từ *C. olitorius* và 37.031 cADN từ *C. capsularis* đã được đọc trình tự một phần hoặc toàn bộ. Từ đó, một cADN đơn lẻ được phát triển từ mỗi loài, mã hóa cho enzym mới, có vai trò giả định, hoạt tính xúc tác được ưu tiên trong việc làm tăng sự sản xuất sợi ở cây đay.

Khung đọc mở (ORF) được phân tích sau khi đọc trình tự toàn bộ hoặc một phần của các dòng của thư viện cADN có nguồn gốc từ mARN *C. olitorius* và *C. capsularis*, và được phân tích thêm bằng cách sử dụng phần mềm phân tích trình tự, và bằng cách xác định sự tương đồng với các trình tự đã biết trong cơ sở dữ liệu (công cộng/tư nhân).

Trong nội dung bản mô tả này, một số thuật ngữ được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả có nghĩa như được chỉ ra trừ khi được chỉ ra rõ ràng là có nghĩa khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “polynucleotit” là trình tự nucleotit chẳng hạn như mảnh axit nucleic. Polynucleotit có thể là polyme của ARN hoặc ADN mà là mạch đơn hoặc mạch đôi, tùy ý có chứa bazơ nucleotit tổng hợp, không tự nhiên hoặc đã được làm thay đổi. Polynucleotit ở dạng polyme của ADN có thể có chứa và/hoặc gồm có một hoặc nhiều đoạn của cADN, ADN hệ gen, ADN tổng hợp, hoặc hỗn hợp/dạng kết hợp của chúng. Polynucleotit được phân lập theo sáng chế có thể bao gồm ít nhất một trong số 150 nucleotit liên tiếp (cả ngược chiều và xuôi chiều) có nguồn gốc từ SEQ ID NO: 1 và, SEQ ID NO: 4, hoặc dạng bổ sung của các trình tự này.

"Polypeptit" như được sử dụng trong bản mô tả này, là mạch thẳng đơn lẻ của các axit amin được liên kết với nhau bằng liên kết peptit, và thường có trình tự có chiều dài lớn hơn 100 axit amin.

"Được phân lập" có nghĩa là được làm thay đổi "bởi bàn tay con người" từ trạng thái tự nhiên. Nếu hợp phần hoặc chất có trong tự nhiên, nó đã "được phân lập" nếu nó được thay đổi hoặc được lấy ra từ môi trường ban đầu của nó, hoặc cả hai. Ví dụ, polynucleotit hoặc polypeptit có trong tự nhiên ở thực vật hoặc động vật sống không "được phân lập", nhưng cùng polynucleotit hoặc polypeptit đó được tách ra từ nguyên liệu đồng tồn tại của trạng thái tự nhiên của nó "được phân lập", như thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này.

Thuật ngữ “gen”, như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ trình tự hệ gen của cây *C. olitorius* và *C. capsularis*, cụ thể là trình tự polynucleotit mã hóa cho trình tự polypeptit của enzym homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 tham gia vào hoạt tính xúc tác được ưu tiên trong việc làm tăng sự sản xuất sợi ở cây đay. Thuật ngữ này có thể còn bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm các trình tự nucleotit ngược chiều, xuôi chiều, và/hoặc intron.

"Trình tự mã hóa" hoặc "vùng mã hóa" dùng để chỉ phân tử axit nucleic có thông tin trình tự cần để sản xuất sản phẩm gen, chẳng hạn như axit amin hoặc polypeptit, khi trình tự này được biểu hiện. Trình tự mã hóa có thể có chứa và/hoặc bao gồm trình tự không dịch mã (bao gồm intron hoặc các vùng không dịch mã 5' hoặc 3') ở trong vùng dịch mã, hoặc có thể thiếu trình tự không dịch mã xen kẽ (ví dụ, như trong cADN).

Thuật ngữ "oligonucleotit", như được sử dụng trong bản mô tả này, là polynucleotit ngắn hoặc một phần của polynucleotit mà có thể có chiều dài tốt hơn là từ 10 đến 1000, tốt nhất là từ 12 đến 50 nucleotit. Theo một phương án của sáng chế, nucleotit chứa trong oligonucleotit có thể là chất tương tự hoặc dẫn xuất của nucleotit có trong tự nhiên.

Thuật ngữ "đoạn môi", như được sử dụng trong bản mô tả này, là oligonucleotit có khả năng liên kết với trình tự axit nucleic đích và làm môi cho sự tổng hợp axit nucleic. Oligonucleotit khuếch đại như được xác định trong bản mô tả này có thể tốt hơn là có chiều dài từ 10 đến 50, tốt nhất là từ 15 đến 25 nucleotit. Ngoài ra, oligonucleotit khuếch đại theo sáng chế có thể được tổng hợp hóa học và oligonucleotit này là axit nucleic không có trong tự nhiên.

Từ viết tắt được sử dụng trong toàn bộ bản mô tả để chỉ axit nucleic bao gồm các trình tự nucleotit là các chữ viết tắt một kí tự thông thường. Do đó, khi được bao gồm trong axit nucleic, nucleotit mã hóa có trong tự nhiên được viết tắt như sau: adenin (A), guanin (G), xytosin (C), tymin (T) và uraxil (U). Ngoài ra, trừ khi có chỉ dẫn khác, trình tự axit nucleic được thể hiện trong bản mô tả này là theo chiều 5' → 3'.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bổ sung" và biến thể của nó được sử dụng để chỉ sự bắt cặp của axit nucleic theo quy tắc đã biết là A bắt cặp với T hoặc U và C bắt cặp với G. Sự bổ sung có thể là "một phần" hoặc "hoàn toàn". Trong sự bổ sung một phần, chỉ một số bazơ axit nucleic được bắt cặp theo quy tắc bắt cặp bazơ; trong khi đó trong sự bổ sung hoàn toàn hoặc toàn bộ, tất cả các bazơ được bắt cặp theo quy tắc bắt cặp này. Mức độ bổ sung giữa các sợi axit nucleic có thể có ảnh hưởng đáng kể lên hiệu quả và độ bền của sự lai hóa giữa các sợi axit nucleic như đã biết trong lĩnh vực. Hiệu quả và độ bền của sự lai hóa này phụ thuộc vào phương pháp phát hiện.

Thuật ngữ "tế bào chủ", như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm dạng tế bào bất kỳ mà dễ bị biến nạp, chuyển nạp, tải nạp, biểu hiện và quy trình tương tự bằng

cấu trúc axit nucleic hoặc vật truyền biểu hiện bao gồm và/hoặc có chứa polynucleotit của sáng chế. Tế bào chủ thích hợp bao gồm tế bào nấm và/hoặc tế bào thực vật, cụ thể là tế bào thực vật sản xuất sợi libe.

Thuật ngữ "được liên kết có điều khiển" trong bản mô tả này thường dùng để chỉ cấu hình trong đó trình tự kiểm soát được đặt ở vị trí thích hợp đối với trình tự mã hóa của trình tự polynucleotit sao cho trình tự kiểm soát định hướng sự biểu hiện của trình tự mã hóa của polypeptit. Ví dụ, trình tự mở đầu có thể được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa khi nó ảnh hưởng đến sự biểu hiện của trình tự mã hóa đó, tức là trình tự mã hóa đó chịu sự kiểm soát phiên mã của trình tự mở đầu.

“Vật truyền” thường dùng để chỉ đơn vị sao chép, chẳng hạn như plasmit, phago, cosmit, nấm men hoặc virus mà đoạn axit nucleic khác có thể được cài xen có điều khiển vào đó sao cho dẫn đến sự sao chép hoặc sự biểu hiện của đoạn này. Thuật ngữ "vật truyền" cũng nhằm để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác đến nơi mà nó được liên kết. Một loại vật truyền là "plasmit", mà dùng để chỉ vòng ADN mạch kép tròn mà đoạn ADN khác có thể được nối vào. Một loại vật truyền khác là vật truyền virus, trong đó đoạn ADN khác có thể được nối vào hệ gen virus. Các vật truyền nhất định có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ mà chúng được đưa vào (ví dụ, vật truyền vi khuẩn có điểm mở đầu sao chép vi khuẩn và vật truyền động vật có vú thuộc thể bổ sung). Các vật truyền khác có thể được hợp nhất vào hệ gen của tế bào chủ khi đưa vào trong tế bào chủ, và bằng cách đó chúng được sao chép cùng với hệ gen vật chủ. Ngoài ra, các vật truyền nhất định có khả năng định hướng sự biểu hiện của gen mà chúng được liên kết có điều khiển với. Các vật truyền này được đề cập đến trong bản mô tả này là "vật truyền biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc đơn giản là "vật truyền biểu hiện"). Nhìn chung, vật truyền biểu hiện để sử dụng trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Trong bản mô tả này, "plasmit" và "vật truyền" có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau vì plasmit là dạng thường được sử dụng nhất của vật truyền. Tuy nhiên, sáng chế được dự định bao gồm các dạng vật truyền biểu hiện khác, chẳng hạn như vật truyền virus (ví dụ, retrovirus, adenovirus và virus kết hợp adeno không có khả năng sao chép), mà có chức năng tương đương.

Thuật ngữ "cấu trúc axit nucleic" hoặc "cấu trúc ADN" đôi khi được dùng để chỉ trình tự hoặc các trình tự mã hóa được liên kết có điều khiển với trình tự điều hòa thích

hợp và được cài xen vào vật truyền để làm biến nạp tế bào. Thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ "ADN biến nạp" hoặc "gen chuyển".

Thuật ngữ "trình tự mở đầu", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ trình tự axit nucleic mà có chức năng định hướng sự phiên mã của gen xuôi chiều. Trình tự mở đầu thường thích hợp với tế bào chủ trong đó gen đích sẽ được biểu hiện. Trình tự mở đầu cùng với trình tự axit nucleic điều hòa phiên mã và dịch mã khác (còn được gọi là "trình tự kiểm soát") là cần thiết để biểu hiện gen nhất định. Nhìn chung, trình tự điều hòa phiên mã và dịch mã bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự mở đầu, vị trí liên kết ribosom, trình tự khởi đầu và kết thúc phiên mã, trình tự khởi đầu và kết thúc dịch mã, và trình tự tăng cường hoặc hoạt hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "polypeptit WUSCHEL" hoặc "polypeptit WUS" có nghĩa là polypeptit có hoạt tính wuschel, tức là, tham gia vào sự khởi đầu và sự duy trì của tế bào mầm ở cây trồng. Hoạt tính wuschel kích thích sự sinh trưởng tế bào, bao gồm tế bào mầm. Wuschel là protein homeodomain thực vật, bao gồm motif homeodomain 'không điển hình' (so với homeodomain động vật) xoắn-thòng lọng-xoắn-vòng cuộn-xoắn có chứa gốc axit amin phụ thêm trong thòng lọng và/hoặc vòng cuộn của miền. Protein wuschel có thể còn có chứa và/hoặc bao gồm các motif được bảo toàn khác, chẳng hạn như hai miền đầu tận C wuschel được bảo toàn, các miền (E/R)TLPLFP và A(A/S)LEL(S/T)L. Thuật ngữ này cũng bao gồm mảnh, biến thể, và thể tương đồng, với chức năng bất kỳ trong số các chức năng nêu trên.

Thuật ngữ "thể tương đồng", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ protein bao hàm peptit, oligopeptit, polypeptit, protein và enzym có sự thể, làm khuyết và/hoặc cài xen axit amin so với protein chưa được cải biến đang quan tâm và có hoạt tính sinh học và chức năng tương tự như protein chưa được cải biến mà chúng bắt nguồn từ đó.

Sự làm khuyết dùng để chỉ sự loại bỏ một hoặc nhiều axit amin từ protein.

Sự cài xen dùng để chỉ một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào vị trí được xác định trước trong protein. Sự cài xen có thể có chứa sự dung hợp đầu tận N và/hoặc đầu tận C cũng như là sự cài xen nội trình tự của axit amin đơn lẻ hoặc nhiều axit amin. Thông thường, sự cài xen ở trong trình tự axit amin sẽ nhỏ hơn sự dung hợp đầu tận N hoặc đầu tận C, ở mức khoảng từ 1 đến 10 gốc.

Sự thế dùng để chỉ sự thay thế axit amin của protein bằng axit amin khác có tính chất tương tự (chẳng hạn như tương tự tính kỵ nước, tính ưa nước, tính kháng nguyên, xu hướng tạo thành hoặc phá vỡ cấu trúc xoắn α hoặc cấu trúc tấm β). Sự thế axit amin thường là ở gốc đơn lẻ, nhưng có thể được nhóm lại tùy thuộc vào sự ràng buộc chức năng đặt lên polypeptit và có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 10 axit amin; sự cài xen thường ở mức từ khoảng 1 đến 10 gốc axit amin. Sự thế axit amin tốt hơn là sự thế axit amin bảo toàn. Bảng sự thế bảo toàn là đã biết trong lĩnh vực (ví dụ xem tài liệu Creighton (1984) *Proteins*. W.H. Freeman and Company (Eds) và Bảng 1 dưới đây).

Bảng 1: Ví dụ về sự thế axit amin bảo toàn

Gốc	Sự thế bảo toàn	Gốc	Sự thế bảo toàn
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

Sự thế, sự làm khuyết và/hoặc sự cài xen axit amin có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật tổng hợp peptit đã biết trong lĩnh vực, chẳng hạn như tổng hợp peptit pha rắn và/hoặc kỹ thuật tổng hợp khác bất kỳ, hoặc bằng thao tác ADN tái tổ hợp. Phương pháp thao tác trình tự ADN để tạo ra biến thể thế, cài xen hoặc làm khuyết của protein là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, kỹ thuật tạo ra đột biến thế ở vị trí được xác định trước trong ADN là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và bao gồm sự gây đột biến M13, sự gây đột biến *in vitro* T7-Gen (USB, Cleveland, OH), sự

gây đột biến định hướng vị trí thay đổi nhanh (Stratagene, San Diego, CA), sự gây đột biến định hướng vị trí qua PCR hoặc các quy trình gây đột biến định hướng vị trí khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “phần có hoạt tính sinh học” có thể dùng để chỉ mảnh của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL có hoạt tính sinh học để xúc tác cho sự khởi đầu, sự tạo thành, sự tăng cường, hoặc sự thay đổi trong hợp phần của sợi libe ở cây trồng *C. olitorius* hoặc *C. capsularis*. Phần có hoạt tính sinh học của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL bao gồm peptit hoặc polypeptit bao gồm trình tự axit amin có đủ độ tương đồng với hoặc có nguồn gốc từ trình tự axit amin của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL, ví dụ, trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6, mà bao gồm ít axit amin hơn so với protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL chiều dài đầy đủ, và thể hiện ít nhất một sự hoạt động của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL. Thông thường, phần có hoạt tính sinh học có chứa miền hoặc motif có ít nhất một hoạt tính của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL. Phần có hoạt tính sinh học của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL có thể là polypeptit mà có chiều dài là, ví dụ, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, hoặc 223 axit amin.

Protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL có thể có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6. Theo phương án khác, protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL về cơ bản tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6, và giữ lại hoạt tính chức năng của protein của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6, vẫn khác biệt ở trình tự axit amin do sự thay đổi hoặc sự gây đột biến alen tự nhiên. Theo phương án khác, protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL có độ tương đồng trình tự axit amin ít nhất là khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc lớn hơn so với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6.

Thuật ngữ "miền", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ tập hợp axit amin được bảo toàn ở các vị trí cụ thể dọc theo sự sắp thẳng hàng của các trình tự của các protein có liên quan về mặt tiến hóa. Mặc dù axit amin ở các vị trí khác có thể thay đổi giữa các thể tương đồng, axit amin mà được bảo toàn cao ở các vị trí cụ thể cho thấy axit amin này dường như là thiết yếu trong cấu trúc, độ ổn định hoặc chức năng của protein. Được xác định bằng mức độ bảo toàn cao của chúng trong các trình tự được sắp

thẳng hàng của họ thể tương đồng protein, chúng có thể được sử dụng làm chất nhận dạng để xác định liệu polypeptit bất kỳ đang quan tâm có thuộc về họ polypeptit đã được xác định từ trước hay không.

Thuật ngữ "motif", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ vùng được bảo toàn ngắn trong trình tự của các protein có liên quan về mặt tiến hóa. Motif thường là các phần được bảo toàn cao của miền, nhưng cũng có thể chỉ bao gồm một phần của miền, hoặc nằm ở bên ngoài miền được bảo toàn (nếu tất cả các của axit amin của motif nằm ngoài miền đã được xác định).

Có các cơ sở dữ liệu chuyên môn để xác định các miền, ví dụ, SMART (Schultz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242-244), InterPro (Mulder et al., (2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315-318), Prosite (Bucher and Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., pp53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res. 32:D134-D137, (2004)), hoặc Pfam (Bateman et al., Nucleic Acids Research 30(1): 276-280 (2002)). Tập hợp công cụ để phân tích *in silico* các trình tự protein có sẵn trên máy chủ proteomics ExPASy (Viện Thông tin sinh học Thụy Sĩ (Gasteiger et al., ExPASy: The Proteomics Server for In Depth Protein Knowledge and Analysis, Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003)). Miền hoặc motif cũng có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật thông thường, chẳng hạn như bằng cách sắp thẳng hàng trình tự.

Nhằm đạt được mục đích của sáng chế, "chuyển gen", "gen chuyển" hoặc "tái tổ hợp" có nghĩa là đối với, ví dụ, trình tự axit nucleic, băng biểu hiện, cấu trúc gen hoặc vật truyền bao gồm và/hoặc có chứa trình tự axit nucleic hoặc sinh vật được biến nạp bằng trình tự axit nucleic, băng biểu hiện hoặc vật truyền theo sáng chế, tất cả các cấu trúc này được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp trong đó: (a) trình tự axit nucleic mã hóa cho protein hữu dụng trong phương pháp theo sáng chế, hoặc (b) (các) trình tự kiểm soát di truyền mà được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic theo sáng chế, ví dụ trình tự mở đầu, hoặc (c) a) và b) không nằm ở môi trường tự nhiên của chúng hoặc đã được cải biến bằng phương pháp tái tổ hợp. Sự cải biến có thể ở dạng, ví dụ, sự thế, sự thêm, sự làm khuyết, sự đảo ngược hoặc sự cài xen của một hoặc nhiều gốc nucleotit. Môi trường di truyền tự nhiên được hiểu là vị trí trong hệ gen hoặc nhiễm sắc thể tự

nhiên ở cây trồng ban đầu hoặc sự có mặt trong thư viện hệ gen. Trong trường hợp thư viện hệ gen, môi trường di truyền tự nhiên của trình tự axit nucleic tốt hơn là được giữ lại, ít nhất là một phần. Môi trường tấn công ở bên sườn trình tự axit nucleic ít nhất ở một phía và có chiều dài trình tự bằng khoảng 50 bp, tốt hơn là bằng khoảng 500 bp. Bảng biểu hiện có trong tự nhiên - ví dụ dạng kết hợp có trong tự nhiên của trình tự mở đầu tự nhiên của trình tự axit nucleic với trình tự axit nucleic tương ứng mã hóa cho polypeptit hữu dụng trong phương pháp theo sáng chế, như xác định ở trên - trở thành bảng biểu hiện chuyển gen khi bảng biểu hiện này được cải biến bằng phương pháp tổng hợp ("nhân tạo"), không tự nhiên chẳng hạn như, ví dụ, xử lý gây đột biến. Phương pháp thích hợp được mô tả, ví dụ, trong tài liệu US 5,565,350 hoặc WO 00/15815.

Do đó, cây trồng chuyển gen để thực hiện mục đích của sáng chế được hiểu là bao gồm các cây trồng trong đó axit nucleic được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế không ở vị trí tự nhiên của chúng trong hệ gen của cây trồng này, và do đó axit nucleic có thể được biểu hiện tương đồng hoặc khác loại. Tuy nhiên, như đã nêu, sự chuyển gen cũng có nghĩa là, mặc dù axit nucleic theo sáng chế hoặc được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế nằm ở vị trí tự nhiên của chúng trong hệ gen của cây trồng, trình tự này đã được cải biến so với trình tự tự nhiên, và/hoặc trình tự điều hòa của các trình tự tự nhiên đã được cải biến. Tốt hơn là sự chuyển gen được hiểu là sự biểu hiện của axit nucleic theo sáng chế ở vị trí không tự nhiên trong hệ gen, trong khi sự biểu hiện tương đồng hoặc, tốt hơn là, khác loại của axit nucleic diễn ra.

Thuật ngữ "đưa vào" hoặc "biến nạp", như được sử dụng trong bản mô tả này, bao hàm sự chuyển polynucleotit ngoại sinh vào tế bào chủ, bất kể phương pháp nào được sử dụng để chuyển. Mô thực vật có khả năng nhân dòng tiếp theo, bằng cách phát sinh cơ quan hoặc phát sinh phôi, có thể được biến nạp bằng cấu trúc di truyền theo sáng chế và cây trồng nguyên vẹn được tái tạo từ đó. Mô cụ thể được chọn sẽ thay đổi tùy thuộc vào hệ thống nhân dòng có sẵn, và thích hợp nhất, đối với loài cụ thể cần được biến nạp. Các đích mô ví dụ bao gồm đĩa lá, phấn, phôi, lá mầm, trụ dưới lá mầm, thể giao tử cái, mô sẹo, mô phân sinh hiện hữu (ví dụ, mô phân sinh đỉnh, chồi nách, và mô phân sinh rễ), và mô phân sinh cảm ứng (ví dụ, mô phân sinh lá mầm và mô phân sinh trụ dưới lá mầm). Polynucleotit có thể được đưa vào tạm thời hoặc ổn định trong tế bào chủ và có thể được duy trì ở dạng không hợp nhất, ví dụ, ở dạng plasmit. Theo cách khác, nó có thể được

hợp nhất vào hệ gen vật chủ. Sau đó, tế bào thực vật biến nạp thu được có thể được sử dụng để tạo ra cây trồng biến nạp theo phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Việc chuyển gen lạ vào hệ gen của cây trồng được gọi là biến nạp.

Sự biến nạp của loài thực vật hiện nay là kỹ thuật khá thông thường. Điều có lợi là, phương pháp biến nạp bất kỳ trong số một vài phương pháp biến nạp có thể được sử dụng để đưa gen mong muốn vào tế bào ông bà thích hợp. Phương pháp được mô tả để biến nạp và tái tạo cây trồng từ mô thực vật hoặc tế bào thực vật có thể được sử dụng để biến nạp tạm thời hoặc ổn định. Phương pháp biến nạp bao gồm việc sử dụng liposom, đực lỗ điện và hóa chất mà làm tăng sự hấp thụ ADN tự do, tiêm ADN trực tiếp vào cây trồng, súng bắn hạt, biến nạp bằng cách sử dụng virus hoặc phấn và vi chiếu ảnh. Cây trồng chuyển gen, bao gồm cây trồng mùa vụ chuyển gen, tốt hơn là được sản xuất thông qua sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*. Phương pháp biến nạp có lợi là biến nạp trong giới thực vật (Sajib et. al. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* (2008) 95, 333-34).

Thông thường sau khi biến nạp, tế bào thực vật hoặc nhóm tế bào được chọn lọc về sự có mặt của một hoặc nhiều gen đánh dấu mà được mã hóa bởi gen có thể biểu hiện ở cây trồng được đồng biến nạp với gen mong muốn, sau đó nguyên liệu được biến nạp được tái tạo vào cây trồng nguyên vẹn. Để chọn lọc cây trồng được biến nạp, nguyên liệu cây trồng thu được trong quy trình biến nạp, về nguyên tắc, được đưa vào điều kiện chọn lọc sao cho cây trồng được biến nạp có thể phân biệt được đối với cây trồng không được biến nạp. Ví dụ, hạt thu được theo phương thức được mô tả ở trên có thể được gieo và, sau giai đoạn phát triển ban đầu, được đưa đi chọn lọc thích hợp bằng cách phun. Khả năng khác nữa bao gồm việc trồng hạt, nếu thích hợp sau khi tiệt trùng, trên đĩa aga bằng cách sử dụng chất chọn lọc thích hợp sao cho chỉ hạt được biến nạp có thể phát triển thành cây trồng. Theo cách khác, cây trồng được biến nạp được sàng lọc về sự có mặt của gen đánh dấu chọn lọc chẳng hạn như các gen được mô tả ở trên.

Sau khi truyền ADN và tái tạo, giả định rằng cây trồng được biến nạp cũng có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách sử dụng phân tích Southern, về sự có mặt của gen mong muốn, số lượng bản sao và/hoặc sự tổ chức hệ gen. Theo cách khác hoặc ngoài ra, mức độ biểu hiện của ADN mới được đưa vào có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng phân

tích Northern và/hoặc Western, cả hai kỹ thuật này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Cây trồng được biến nạp được tạo ra có thể được nhân lên bằng nhiều phương pháp, chẳng hạn như bằng cách nhân dòng hoặc kỹ thuật gây giống cổ điển. Ví dụ, cây trồng được biến nạp thế hệ thứ nhất (hay T1) có thể được chọn lọc và thế biến nạp thế hệ thứ hai đồng hợp tử (hay T2) có thể được chọn lọc, và sau đó cây trồng T2 có thể được tiếp tục nhân lên bằng kỹ thuật gây giống cổ điển. Sinh vật biến nạp được tạo ra có thể có nhiều dạng. Ví dụ, chúng có thể là thể khảm của tế bào được biến nạp và tế bào không được biến nạp; thể biến nạp đơn dòng (ví dụ, tất cả các tế bào được biến nạp đều có chứa băng biểu hiện); cành ghép của mô được biến nạp và không được biến nạp (ví dụ, ở cây trồng, thân rễ được biến nạp được ghép vào chồi không được biến nạp).

Thuật ngữ "sự biểu hiện tăng" hoặc "sự biểu hiện quá mức" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ dạng bất kỳ của sự biểu hiện mà tăng thêm so với mức độ biểu hiện kiểu đại ban đầu.

Phương pháp làm tăng sự biểu hiện của gen hoặc sản phẩm gen đã được ghi nhận trong tài liệu trong lĩnh vực và bao gồm, ví dụ, sự biểu hiện quá mức được làm cho diễn ra bằng trình tự mở đầu thích hợp, bằng cách sử dụng gen tăng cường phiên mã hoặc gen tăng cường dịch mã. Axit nucleic được phân lập mà đóng vai trò làm trình tự mở đầu hoặc yếu tố tăng cường có thể được đưa vào vị trí thích hợp (thường là ngược chiều) của dạng không khác loại của polynucleotit sao cho điều hòa tăng sự biểu hiện của axit nucleic mã hóa cho polypeptit mong muốn. Ví dụ, trình tự mở đầu nội sinh có thể được làm thay đổi *in vivo* bằng đột biến, sự làm khuyết, và/hoặc sự thế (xem tài liệu, Kmiec, US 5,565,350; Zarling et al., WO9322443), hoặc trình tự mở đầu được phân lập có thể được đưa vào tế bào thực vật theo hướng thích hợp và ở cách gen theo sáng chế một khoảng sao cho kiểm soát sự biểu hiện của gen.

Nếu sự biểu hiện polypeptit là điều mong muốn, thường mong muốn bao gồm vùng polyadenyl hóa ở đầu 3' của vùng mã hóa polynucleotit. Vùng polyadenyl hóa có thể là có nguồn gốc từ gen tự nhiên, từ nhiều loại gen thực vật khác, hoặc từ T-ADN. Trình tự đầu 3' cần được bổ sung vào có thể có nguồn gốc từ, ví dụ, gen nopalin syntaza hoặc gen octopin syntaza, hoặc theo cách khác là từ gen thực vật khác, hoặc kém hơn là từ gen sinh vật nhân chuẩn khác bất kỳ.

Trình tự intron cũng có thể được bổ sung vào vùng không dịch mã 5' (UTR) hoặc trình tự mã hóa của một phần trình tự mã hóa để làm tăng lượng thông tin trưởng thành tích lũy trong dung dịch bào tương. Sự bao gồm của chỗ nối làm cho intron trong đơn vị phiên mã ở cả cấu trúc biểu hiện thực vật và động vật được thể hiện để làm tăng sự biểu hiện gen ở cả cấp độ mRNA và protein lên đến 1000 lần (Buchman and Berg (1988) *Mol. Cell Biol.* 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) *Genes Dev* 1:1183-1200). Sự tăng cường intron này của sự biểu hiện gen thường lớn nhất khi đặt ở gần đầu 5' của đơn vị phiên mã. Việc sử dụng các intron ngô như intron Adh1-S 1, 2, và 6, intron Bronze-1 là đã biết trong lĩnh vực. Thông tin chung về chúng xem trong tài liệu: *The Maize Handbook*, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994).

Để xác định sự tương đồng theo tỷ lệ phần trăm của hai trình tự axit amin hoặc của hai trình tự axit nucleic, các trình tự có thể được sắp thẳng hàng nhằm mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, chỗ trống có thể được đưa vào một hoặc cả hai trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic thứ nhất hoặc thứ hai để sắp thẳng hàng tối ưu và các trình tự không tương đồng có thể bị bỏ qua khi so sánh). Chiều dài của trình tự tham chiếu được sắp thẳng hàng để so sánh có thể bằng ít nhất 95% chiều dài của trình tự tham chiếu này. Sau đó, gốc axit amin hoặc nucleotit ở vị trí axit amin hoặc vị trí nucleotit tương ứng có thể được so sánh. Khi vị trí ở trình tự thứ nhất được chiếm giữ bởi cùng gốc axit amin hoặc nucleotit như vị trí tương ứng ở trình tự thứ hai, thì các phân tử tương đồng ở vị trí đó (như được sử dụng trong bản mô tả này “sự tương đồng” axit amin hoặc axit nucleic là tương đương với “sự đồng đều” axit amin hoặc axit nucleic). Sự tương đồng theo tỷ lệ phần trăm giữa hai trình tự là hàm của số lượng vị trí tương đồng giữa các trình tự, có tính đến số lượng chỗ trống, và chiều dài của mỗi chỗ trống, mà cần phải được đưa vào để sắp thẳng hàng tối ưu hai trình tự.

Việc so sánh các trình tự và xác định sự tương đồng theo tỷ lệ phần trăm giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán. Theo một phương án, sự tương đồng theo tỷ lệ phần trăm giữa hai trình tự axit amin có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán Needleman và Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) mà đã được kết hợp vào chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có sẵn ở <http://www.gcg.com>), bằng cách sử dụng ma trận Blosum 62 hoặc ma trận PAM250, và tải trọng chỗ trống bằng 16, 14, 12, 10, 8, 6, hoặc 4 và tải trọng chiều dài bằng 1, 2, 3, 4,

5, hoặc 6. Theo phương án được ưu tiên khác nữa, sự tương đồng theo tỷ lệ phần trăm giữa hai trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng chương trình GAP trong gói phần mềm GCG (có sẵn ở <http://www.gcg.com>), bằng cách sử dụng ma trận NWSgapdna.CMP và tải trọng chỗ trống bằng 40, 50, 60, 70, hoặc 80 và tải trọng chiều dài bằng 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6. Theo phương án khác, sự tương đồng theo tỷ lệ phần trăm giữa hai axit amin hoặc các trình tự nucleotit có thể được xác định bằng cách sử dụng thuật toán của E. Meyers và W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988)) mà đã được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0 hoặc 2.0U), bằng cách sử dụng bảng gốc tải trọng PAM120, khoản bù chiều dài chỗ trống bằng 12 và khoản bù chỗ trống bằng 4.

Chương trình máy tính ví dụ mà có thể được sử dụng để xác định sự đồng đều giữa hai trình tự bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dãy chương trình BLAST, ví dụ, BLASTN, BLASTX, và TBLASTX, BLASTP và TBLASTN, có thể truy cập công cộng ở www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

Nghiên cứu trình tự thường được thực hiện bằng cách sử dụng chương trình BLASTN, khi đánh giá trình tự axit nucleic nhất định đối với trình tự axit nucleic trong trình tự ADN GenBank và các cơ sở dữ liệu công khai khác. Chương trình BLASTX được ưu tiên để nghiên cứu trình tự axit nucleic mà được dịch mã trong tất cả các khung đọc so với trình tự axit amin trong các trình tự protein GenBank và các cơ sở dữ liệu công khai khác.

Sự sắp xếp trình tự được ưu tiên của các trình tự được chọn để xác định "% tương đồng" giữa hai hoặc nhiều trình tự được thực hiện bằng cách sử dụng ví dụ, chương trình CLUSTAL-W.

Như nêu ở trên, một phương án của sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập mã hóa cho polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL được tìm thấy ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis* lần lượt bao gồm và/hoặc có chứa trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 5. Một cách tương ứng, polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL tương ứng được mã hóa bởi trình tự nucleotit mang trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6. Theo một phương án của sáng chế, SEQ ID NO: 3 dùng để chỉ trình tự polypeptit của có nguồn gốc từ thể tương đồng homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) *C. olitorius*, và SEQ ID

NO: 6 dùng để chỉ trình tự polypeptit của thể tương đồng homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) có nguồn gốc từ *C. capsularis*. Cả hai enzym này có mặt trong con đường tổng hợp sinh học của sợi ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis* để xúc tác cho phân tử khởi đầu để làm môi cho sự tổng hợp sinh học của tế bào sợi ở thực vật.

Sáng chế cũng đề xuất gen trình tự mã hóa cho thể tương đồng homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) từ cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis*.

Theo một phương án, polynucleotit dài 1250 bp được minh họa trong SEQ ID NO: 1 là gen chiều dài đầy đủ được phân lập từ *C. olitorius*. Trình tự gen này bao gồm ít nhất 150 nucleotit liên tiếp từ cả ngược chiều và xuôi chiều của gen. Phương án này cũng đề xuất trình tự intron của gen.

Theo phương án khác, polynucleotit dài 1237 bp được minh họa trong SEQ ID NO: 4 là gen chiều dài đầy đủ được phân lập từ *C. capsularis*. Trình tự gen này bao gồm ít nhất 150 nucleotit liên tiếp từ cả ngược chiều và xuôi chiều của gen. Phương án này cũng đề xuất trình tự intron của gen.

Theo phương án khác nữa của sáng chế, polynucleotit được phân lập mã hóa cho polypeptit bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 5 được đề xuất. SEQ ID NO: 2 dùng để chỉ trình tự polynucleotit của trình tự thể tương đồng homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) có nguồn gốc từ *C. olitorius* và SEQ ID NO: 5 dùng để chỉ trình tự polynucleotit của trình tự thể tương đồng homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) có nguồn gốc từ *C. capsularis*.

Theo phương án khác nữa, phân tử axit nucleic được phân lập mà có khả năng mã hóa cho polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của chúng, có chứa trình tự nucleotit mà có độ tương đồng ít nhất là khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc lớn hơn độ tương đồng so với toàn bộ chiều dài của trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung bất kỳ của chúng.

Theo một phương án, polynucleotit dài 669 bp được minh họa trong SEQ ID NO: 2 là protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4) được mã hóa bởi dòng cADN chiều dài đầy đủ thể hiện khung đọc mở mã hóa cho polypeptit có 222 axit amin, như trong SEQ ID NO: 3, có số khối phân tử tính được bằng khoảng 25,54 kD. Thông

qua phân tích SMART của SEQ ID NO: 3, đã phát hiện ra sự có mặt của miền homeobox trong trình tự. Đây là yếu tố liên kết ADN, mà tham gia vào sự điều hòa phiên mã của các quy trình phát triển then chốt của cây trồng. Đây là protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4) tham gia vào sự tăng sinh tế bào mạch của cây trồng.

Theo một phương án, polynucleotit dài 672 bp được minh họa trong SEQ ID NO: 5 là protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4) được mã hóa bởi dòng cADN chiều dài đầy đủ thể hiện khung đọc mở mã hóa cho polypeptit có 223 axit amin, như trong SEQ ID NO: 6, có số khối phân tử tính được bằng khoảng 25,67 kD. Thông qua phân tích SMART của SEQ ID NO: 6, đã phát hiện ra sự có mặt của miền homeobox trong trình tự. Đây là yếu tố liên kết ADN, mà tham gia vào sự điều hòa phiên mã của các quy trình phát triển then chốt của cây trồng. Đây là protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4) tham gia vào sự tăng sinh tế bào mạch của cây trồng.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, polynucleotit được phân lập được minh họa trong SEQ ID NO: 2 có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR của vùng được bảo toàn của gen bằng cách sử dụng ARN tổng số được phân lập từ cây *C. olitorius* và SEQ ID NO: 5 có thể thu được bằng cách khuếch đại PCR của vùng được bảo toàn của gen này bằng cách sử dụng ARN tổng số được phân lập từ cây *C. capsularis*. Như nêu trong phần mô tả trên đây, cây *C. olitorius* được sử dụng là giống O-4 và *C. capsularis* được sử dụng là giống CVL-1.

Theo phương án khác của sáng chế, sáng chế đề xuất cấu trúc gen tái tổ hợp bao gồm polynucleotit có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 4, trong đó polynucleotit có thể biểu hiện được ở tế bào chủ, và có thể dịch mã để sản xuất thể tương đồng của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4) ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis*. Quy trình khuếch đại, tách dòng và đọc trình tự homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) từ cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis* được mô tả chi tiết hơn ở ví dụ 2. Tốt hơn là, cấu trúc gen tái tổ hợp còn có chứa vùng trình tự mở đầu được liên kết có điều khiển để tăng cường sự biểu hiện của khuôn polynucleotit. Trong sự kiểm soát phiên mã của trình tự mở đầu cụ thể, sự biểu hiện của vùng mã hóa ở trong cấu trúc gen tái tổ hợp có chứa polynucleotit theo SEQ ID NO: 2 và/hoặc SEQ ID NO: 4 sau đó có thể được tăng cường, dẫn đến năng suất cao hơn của protein homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX 4).

Theo một phương án của sáng chế, sự biểu hiện được điều biến là sự biểu hiện hoặc hoạt tính tăng, ví dụ sự biểu hiện quá mức của phân tử axit nucleic mã hóa cho polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL, ví dụ, của phân tử axit nucleic mã hóa cho SEQ ID NO: 2 và SEQ ID NO: 5. Phương pháp làm tăng sự biểu hiện của axit nucleic hoặc gen, hoặc sản phẩm gen, đã được ghi nhận trong tài liệu trong lĩnh vực và các ví dụ được nêu trong phần định nghĩa.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất cây trồng chuyển gen có năng suất sợi được tăng cường đối với cây trồng đối chứng, bao gồm đưa vào và biểu hiện ở cây trồng axit nucleic bất kỳ mã hóa cho polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL như được xác định ở trên trong bản mô tả này.

Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất cây trồng chuyển gen có năng suất sợi được tăng cường so với cây trồng đối chứng trống, mà phương pháp này bao gồm các bước:

(i) đưa vào và biểu hiện ở cây trồng hoặc tế bào thực vật axit nucleic hoặc cấu trúc di truyền mã hóa cho polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL bao gồm và/hoặc có chứa axit mã hóa cho nucleic polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL; và

(ii) cấy tế bào thực vật trong điều kiện thúc đẩy sự sinh trưởng và sự phát triển tế bào sợi.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến polynucleotit được phân lập mà mã hóa cho polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL, và có nguồn gốc từ cây trồng *C. olitorius*, có chứa phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm có:

a) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc dạng bổ sung của chúng; và

b) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc dạng bổ sung của chúng.

Theo các phương án nhất định, cây *C. olitorius* là giống O-4.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic được phân lập mà mã hóa cho polypeptit HOMEOBX 4 liên quan đến WUSCHEL và có nguồn gốc từ cây trồng *C. capsularis*, có chứa phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm có:

- a) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng; và
- b) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng.

Theo các phương án nhất định, cây *C. capsularis* là giống CVL-1.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến polypeptit HOMEOBX 4 liên quan đến WUSCHEL được phân lập bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của chúng, polypeptit này có chức năng được chọn từ nhóm gồm có xúc tác cho sự khởi đầu, sự tạo thành, sự tăng cường, và sự thay đổi, để bằng cách đó cải biến hợp phần của sợi libe ở cây trồng *C. olitorius*.

Theo các phương án nhất định, cây *C. olitorius* là giống O-4.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến polypeptit HOMEOBX liên quan đến WUSCHEL 4 được phân lập có chứa trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO: 6, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của chúng, polypeptit này có một hoặc nhiều chức năng được chọn từ nhóm gồm có xúc tác cho sự khởi đầu, sự tạo thành, sự tăng cường, và sự thay đổi, để bằng cách đó cải biến hợp phần của sợi libe ở cây trồng *C. capsularis*.

Theo các phương án nhất định, cây *C. capsularis* là giống CVL-1.

Theo các phương án nhất định, polypeptit này có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 6.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến cấu trúc gen tái tổ hợp bao gồm polynucleotit được chọn từ nhóm gồm có:

- a) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng; và

b) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng, trong đó polynucleotit có thể biểu hiện được ở tế bào chủ để sản xuất thể tương đồng của polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis*.

Theo các phương án nhất định, cấu trúc này còn có chứa vùng trình tự mở đầu được liên kết có điều khiển với

a) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng; hoặc

b) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng, trong đó trình tự mở đầu này làm tăng cường sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của phân tử axit nucleic.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến thể biến nạp bao gồm cấu trúc gen tái tổ hợp có khả năng biểu hiện polynucleotit được chọn từ nhóm gồm có:

a) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng; và

b) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng, trong đó thể biến nạp này sản xuất thể tương đồng của polypeptit HOMEBOX 4 liên quan đến WUSCHEL.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất cây trồng hoặc cây trồng chuyển gen có năng suất sợi được làm tăng hoặc được tăng cường so với cây trồng đối chứng, bao gồm:

a) đưa vào tế bào thực vật cấu trúc gen tái tổ hợp bao gồm polynucleotit được chọn từ nhóm gồm có: i) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng; và ii) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng,

b) cấy tế bào thực vật trong điều kiện để thúc đẩy sự sinh trưởng và sự phát triển của cây trồng; và

c) biểu hiện polypeptit được chọn từ nhóm gồm có: i) polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của chúng; và ii) polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6.

Các trình tự được đề xuất bởi sáng chế cũng có thể được sử dụng làm nguyên liệu chuẩn bị để cải biến hoặc thiết kế hợp lý enzym mới có các đặc tính mà làm cho enzym có khả năng hoạt động tốt hơn trong các quy trình khó khăn.

Bản mô tả này bao gồm nội dung như nêu trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo, cũng như là trong phần mô tả trên đây. Mặc dù sáng chế này được mô tả ở các phương án ưu tiên của nó ở mức độ cụ thể nhất định, cần hiểu rằng việc bộc lộ các phương án ưu tiên được tạo ra chỉ bằng cách lấy ví dụ và nhiều thay đổi về chi tiết của cấu trúc và dạng kết hợp và sự sắp xếp của các phần có thể được viện đến mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế và yêu cầu bảo hộ.

Nhiều tài liệu tham khảo khác nhau được viện dẫn trong bản mô tả này, việc viện dẫn này hoàn toàn chỉ nhằm mục đích tham khảo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nhằm để minh họa thêm cho sáng chế, mà không dự định làm sáng chế bị giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả trong bản mô tả này.

Ví dụ 1 Thiết kế và tổng hợp đoạn môi

Các đoạn môi được sử dụng trong nghiên cứu này được thiết kế từ hệ phiên mã được điều chỉnh thủ công và “mẫu gen” được dự đoán đối với trình tự hệ gen của *C. olitorius* và *C. capsularis*, bằng cách lựa chọn một cách thủ công các trình tự có ORF hoàn chỉnh hoặc bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu trong đó gen tương tự đã được phân lập thành công từ cây trồng khác. Phân tích thông tin sinh học so sánh của các trình tự nucleotit thu được từ hệ phiên mã được thực hiện bằng cách sử dụng NCBI BLAST, BLASTP, RPS-BLAST, BLASTX và PSI-BLAST để nhận diện thể tương đồng của các gen liên quan và để nhận diện chính xác gen. Sự sắp thẳng hàng trình tự nucleotit được thực hiện bằng clustalW phiên bản 1.82 bất cứ khi nào các trình tự phức hợp được tìm

thấy từ “vốn gen”. Sau đó, sự sắp thẳng hàng được hiệu chỉnh. Đoạn mỗi đặc hiệu gen (cả xuôi và ngược) được chọn lọc thủ công hoặc thông qua công cụ Primer 3 plus và đoạn mỗi được tổng hợp theo yêu cầu.

Tất cả các oligonucleotit được sử dụng trong nghiên cứu này được tổng hợp và được tinh chế HPLC bởi nhà cung cấp và được mua của hãng Integrated DNA Technologies (IDT). Dung dịch dự trữ khoảng 100 pmol được điều chế trong ddH₂O đã được thanh trùng và được lưu trữ ở nhiệt độ khoảng -20°C, phân chia thành các phần riêng để sử dụng.

Các trình tự oligonucleotit được dùng làm đoạn mỗi để PCR

Tên đoạn mỗi	SEQ ID NO	Trình tự oligonucleotit	Sản phẩm được khuếch đại từ cADN
COL F	1	CCATGGGAAACATGAAGGTGC	682
COL R	1	TGAAACGTCCATCATCTGCCT	
CCA F	4	CCATGGGAAACATGAAGGTGC	675
CCA R	4	TTCATGATCTGCCTTCCGGG	

Ví dụ 2 Khuếch đại, tách dòng và đọc trình tự của homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 từ *C. olitorius* và *C. capsularis*

ARN tổng số được phân lập từ hạt ba ngày tuổi sinh trưởng trên môi trường MS như đã được mô tả từ trước bởi Chomczynski P và Sacchi N, phương pháp một bước để phân lập ARN bằng cách chiết axit guanidinium thioxyanat-phenol-clorofom. (Anal Biochem 1987, 162: 156-159). Chất lượng hoặc tính toàn vẹn của ARN được kiểm tra bằng sắc ký trên gel agarosa và được định lượng bằng cách sử dụng Thermo Scientific Nano Drop 2000 theo quy trình tiêu chuẩn. Mạch thứ nhất cADN được tổng hợp bằng cách sử dụng enzym phiên mã ngược SuperScript III (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen được khuếch đại từ cADN bằng PCR bằng cách sử dụng đoạn mỗi đặc hiệu gen. Phản ứng PCR (50 µl) có chứa 1 µl cADN, 20 pmol của mỗi đoạn mỗi, 5 µl 10X chất đệm PCR, 5 µl hỗn hợp 2,5 mM dNTP và 1,0 đơn vị ADN polymeraza PfuTaq. PCR được tiến hành trong máy luân nhiệt (Applied Biosystems) bằng cách sử dụng các điều kiện sau: làm biến tính ban đầu trong thời gian khoảng 5 phút ở nhiệt độ xấp xỉ

95°C, sau đó là 35 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ xấp xỉ 95°C trong thời gian khoảng 30 giây, ủ (bắt cặp mồi) ở nhiệt độ xấp xỉ 59-61°C trong thời gian khoảng 30 giây và kéo dài ở nhiệt độ xấp xỉ 72°C trong thời gian khoảng 1 phút, với sự kéo dài cuối cùng ở nhiệt độ xấp xỉ 72°C trong thời gian khoảng 7 phút. Sản phẩm PCR được phân tích bằng gel agarosa 1% bằng cách sử dụng 1X chất đệm TAE và sản phẩm khuếch đại được rửa giải từ gel bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAGEN theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR đã tinh sạch được nối vào bộ kit tách dòng pCR®8/GW/TOPO® TA (Invitrogen) và được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến (Invitrogen). Plasmid được phân lập từ các khuẩn lạc giả định bằng cách sử dụng bộ kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Việc có hay không sự cài xen được kiểm tra bằng cách sử dụng đoạn mồi đặc hiệu gen và plasmid dương tính được đưa đi đọc trình tự.

Ví dụ 3 Phân tích trình tự

Trình tự nucleotit và trình tự axit amin lần lượt được phân tích bằng các chương trình BLASTN và BLASTP. Các trình tự được báo cáo từ cây trồng khác được sắp thẳng hàng bằng ClustalW. Phân tích phát sinh loài được tiến hành bằng cách sử dụng Neighbour Joining (NJ).

Ví dụ 4 Xây dựng con đường sinh tổng hợp sợi

Vai trò hiển thị xây dựng lại con đường chuyển hóa tự động của homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) trong sự sinh tổng hợp sợi được xây dựng bằng cách xác định các đồng đẳng thích hợp từ protein *C. olitorus* và *C. capsularis* so với hệ gen *Arabidopsis*. Các phản ứng enzym được xúc tác bởi homeobox liên quan đến WUSCHEL 4 (WOX 4) được mã hóa ở trong hệ gen *C. olitorus* và *C. capsularis* được xây dựng bằng cách sử dụng các phản ứng enzym có sẵn trong cơ sở dữ liệu Resnet-Plant 3.0 đối với Pathway Studio cũng như là từ cơ sở dữ liệu con đường trao đổi chất.

Tài liệu tham khảo được viện dẫn

Tất cả các bằng sáng chế Mỹ, các đơn sáng chế đã công bố Mỹ, và các đơn PCT đã công bố được viện dẫn trong bản mô tả này chỉ nhằm mục đích tham khảo.

Dạng tương đương

Mặc dù một số phương án của sáng chế đã được mô tả và được minh họa trong bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ dễ dàng hình dung ra nhiều phương tiện và/hoặc cấu trúc khác để thực hiện các chức năng và/hoặc thu được kết quả và/hoặc một hoặc nhiều ưu điểm được mô tả trong bản mô tả này, và mỗi sự thay đổi và/hoặc cải biến này được cho là thuộc phạm vi của sáng chế. Chỉ cần sử dụng các thí nghiệm thông thường, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vẫn có thể nhận diện, hoặc có khả năng xác định, nhiều dạng tương đương đối với các phương án cụ thể của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, cần hiểu rằng các phương án nêu trên được thể hiện chỉ nhằm làm ví dụ và, nằm trong phạm vi của các yêu cầu bảo hộ kèm theo và các dạng tương đương của chúng; sáng chế có thể được thực hiện theo các khác với cách được mô tả và được yêu cầu bảo hộ cụ thể.

Các trình tự SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO : 1
 CHIỀU DÀI : 1250 bp
 LOẠI : ADN
 TÊN DẤU HIỆU/CHÌA KHÓA : Intron, exon bao gồm UTR 5' 150 bp và UTR 3' 150 bp
 SINH VẬT : Cây đay, *C. olitorius*

ACCTCATCATTTGGTCTTGGTTCTTCAAAGCACCACTCATATCCCACTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
 TAAAATTTTATTTTTTGGGTAAATTTATTTTTGTTATTATATAATCAGAGCATTCTCCCCATCATTC
 CTCCTTCACCATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAACCCTCCCTC
 TCCCTTGGTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCTTCTCTTCCCCTGATCATACTT
 CCGTCTCCTCTTTGACCTTAAGACCTTCATTTCGTCCCGAAAGTGGCCCCGAAAACCTTGGCCTTCTGA
 CGACAAGCGAGATTCTCATTTCTCCCCAGGTACTTACAAATATCCATGAAATGAAACCTTTTATTTTTCC
 AATGATGTATATAATTAGTGGGGAAGGATAAGATTTTGAACCTACGATGAACAATAACAGTGTGGAAAGT
 TGATAATCAAAGGTTAAGAATGTGAAGCTGAAACTTTTTCTTTTTTTTGGTTATGTAGGTGGAAACGCA
 CCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGCAAGAGCAGATAGGGATATTGGAGATGCTGTATAGAGGTGGG
 ATGCGAACTCCAAATGCACAGCAAATAGAACAGATCACTGCACAGTTAGGCAAGTACGGGAAGATCGAAG
 GCAAAAACGTTTTCTATTGGTTCCAAAACCAAAAGCACGCGAAAGGCAAAAGCAGAAGCGTAACAGTCT
 TGGTCTTAGCCATTCTCCCAGAACTCTGCTCCCATACCACCATAACTTTGGACTCTAGGGTAAGTTCA
 AACCAACAAAACCTTTCTTTGTATATATATAACGGTTAGTTTTTTAGTTTTTACTTCTTATAAACAGCAA
 TTAACATTAATGTTTTTGTATATATATAGGGGGAAGTAATGGAGAGAGAGGAGGATAGTCCATATAAG
 AGAAAGTGATGAGCTGGTCATTTGAGTACTTAGAAGAAGAAAGCAGATCATCATCGTCGAGTCAAGAGG
 AGGAAAACAGAACTCTGGAGCTTTTCCCATTGCACCCGGAAGGCAGATGATGGACGTTTCAACTTTGAAA
 AACAAGGAAAAAGGGAAGCTTAACCCAAAACCAAAAAGACTGCTACAAAACCCAAAACCTCTGTTCCCAT
 TATGAAATGATAACATATGCTTTGATGATCCATGATGATGATGATGATAATGAAGCTGA

SEQ ID NO : 2
 CHIỀU DÀI : 669 bp
 LOẠI : ADN
 SINH VẬT : Cây đay, *C. olitorius*
 TÊN DẤU HIỆU/CHÌA KHÓA : CDS
 VỊ TRÍ : (1) (669)

ATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAACCCTC
 CCTCTCCCTTGGTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCTTCCTCT
 TCCCCTGATCATACTTCCGTCTCCTCTTTCGACCTTAAGACCTTCATTTCGTCCCGAAA
 GTGGCCCCCGAAAACCTTTGCCCTTCTGACGACAAGCGAGATTCTCATTCTCCCCAGG
 TGGAACGCACCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGCAAGAGCAGATAGGGAT

ATTGGAGATGCTGTATAGAGGTGGGATGCGAACTCCAAATGCACAGCAAATAGAAC
 AGATCACTGCACAGTTAGGCAAGTACGGGAAGATCGAAGGCCAAAAACGTTTTCTAT
 TGGTTCCAAAACCACAAAGCACGCGAAAGGCCAAAAGCAGAAGCGTAACAGTCTTGG
 TCTTAGCCATTCTCCCAGAACTCTGCTCCCATACCACCATAACTTTGGACTCTAGG
 GGGGAAGTAATGGAGAGAGAGGAGGATAGTCCATATAAGAGAAAGTGTAGGAGCT
 GGTCATTTGAGTACTTAGAAGAAGAAAGCAGATCATCATCGTCGAGTCAAGAGGAG
 GAAAACAGAACTCTGGAGCTTTTCCCATTCGACCCGGAAGGCAGATGA

SEQ ID NO : 3
 CHIỀU DÀI : 222
 LOẠI : PRT
 SINH VẬT : Cây đay, *C. olitorius*

MGNMKVHQLARGLWEHEPSLSLGCKRLRPLAPKLHPSSSPDHTSVSSFDLKTFFIRPESGPRKLCPSDDKR
 DSHSPQVETHPGGTRWNPTQEIQIGILEMLYRGGMRTPNAQQIEQITAQLGKYGKIEGKNVIFYWFQNHKAR
 ERQKQKRNSLGLSHSPRNSAPITTTITLDSRGEVMEREEDSPYKRKCRSWSFEYLEEESRSSSSSQEENR
 TLELFPLHPEGR*

SEQ ID NO : 4
 CHIỀU DÀI : 1237 bp
 LOẠI : ADN
 TÊN DẤU HIỆU/CHÌA KHÓA : Intron, exon bao gồm UTR 5' 150 bp và UTR 3' 150 bp
 SINH VẬT : Cây đay, *C. capsularis*

TCACAAGTCAACCTCACCTCATCATTTGGTCTTGGTTCTTCAAAGCACCACTCATATCCCACCTCCTTT
 TTCAATTTTAAATTTTTTTTGGGGTTAAATTTATTTGGTTATATAATCAGAGCATCTCCCCATCATTC
 CTCCTTCACCATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAACCTCCCTC
 TCCCTTGGTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCTTCCTCTTCCCCTGATCATACTT
 CCGTCTCCTCTTTTCGACCTTAAGACCTTCATTTCGTCCCGAAAGTGGCCCCCGGAAACTTTGCCCTTCTGA
 CGACAAGCGAGATTCTCATTTCTCGCCAGGTACTTAAAAATTAATATCCATGAAATAATTTGTGGGGAAGG
 ATAAGTTTTGAACCTAATGCATAATAACAGTGTGGAACTTAATAGGTTAAGAATATTTGAAGAACTTCT
 ATATATATGAAGCTGAACTTTTTTTGTGGTGTGTAGGTGGAAACGCACCCAGGGGGAACGCGGTGGAAT
 CCGACGCAAGAGCAGATAGGGATACTGGAGATGCTGTATAGAGGTGGGATGCGAACTCCAAATGCACAGC
 AAATAGAACAGATCACTGCACAGCTAGGCAAGTACGGCAAGATCGAAGGCCAAAACGTTTTCTATTGGTT
 CCAAACCACAAAGCACGCGAAAGGCCAAAAGCAGAAGCGTAACAGTCTTGGTCTTAGCCATTCTCCCAGA
 AACTCAGCTCCCATTACCACTATAACTTTGGACACTAGGGTAAGTTCAAACCAACAAAACCTTTCTGTG
 TATATATATATATAACGGTTAGTTTTTAGTTTTTACTTCTTATAAACAGAGAAAATTAACAATGTTTGTG
 TTTATATATATATAGGGGGAAGTAATGGAAAGAGAGGAGGATAGTCCATATAAGAGAAAGTGTAGGAGCT
 GGTCTTTTGAGTACTTAGAAGAAGAAAGCAGATCATCATCGTCGAGTCAAGAGGAGGAAAACAGAACTCT

GGAGCTTTTCCCATTTGCACCCGGAAGGCAGATCATGAAGGGGGTTTCAACTTTCAACTTTCAACTTTCAA
CTTTCAAAATGAAGGGAAAAGGGAAGCTTAACCCAAAACCAAAAAGACTGCTACAAAACCCAAAACCTCTG
TTCCCATTTATGAAATGATAAACTTATGCTTTGATGATCGATCCATG

SEQ ID NO : 5
CHIỀU DÀI : 672
LOẠI : ADN
SINH VẬT : Cây đay, *C. capsularis*
TÊN DẤU HIỆU/CHÌA KHÓA : CDS
VỊ TRÍ : (1) (672)

ATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAACCCTCCCTCTCCCTTGGTT
GCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCTTCCTCTTCCCCTGATCATACTTCCGTCTCCTC
TTTCGACCTTAAGACCTTCATTCGTCCCGAAAGTGGCCCCCGGAACTTTGCCCTTCTGACGACAAGCGA
GATTCTCATTCTCGCCAGGTGGAAACGCACCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGCAAGAGCAGATAG
GGATACTGGAGATGCTGTATAGAGGTGGGATGCGAACTCCAAATGCACAGCAAATAGAACAGATCACTGC
ACAGCTAGGCAAGTACGGCAAGATCGAAGGCAAAAACGTTTTCTATTGGTTCCAAAACCACAAAGCACGC
GAAAGGCAAAAGCAGAAGCGTAACAGTCTTGGTCTTAGCCATTCTCCCAGAACTCAGCTCCCATTACCA
CTATAACTTTGGACACTAGGGGGGAAGTAATGGAAAGAGAGGAGGATAGTCCATATAAGAGAAAGTGTA
GAGCTGGTCTTTTGAGTACTTAGAAGAAGAAAGCAGATCATCATCGTCGAGTCAAGAGGAGGAAAACAGA
ACTCTGGAGCTTTTCCCATTTGCACCCGGAAGGCAGATCATGA

SEQ ID NO : 6
CHIỀU DÀI : 223
LOẠI : PRT
SINH VẬT : Cây đay, *C. capsularis*

MGNMKVHQLARGLWEHEPSLSLGCKRLRPLAPKLHPSSSPDHTSVSSFDLKTFIRPESGPRKLCPSDDKR
DSHSRQVETHPGGTRWNPTQEQIGILEMLYRGGMRTPNAQQIEQITAQLGKYGKIEGKNVIFYWFQNHKAR
ERQKQKRNSLGLSHSPRNSAPITTTITLDRGEVMEREEDSPYKRKCRSWSFEYLEEESRSSSSSQEENR
TLELFPLHPEGRS*

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit được phân lập mà mã hóa cho polypeptit homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL (WOX4) và có nguồn gốc từ cây trồng *C. olitorius* hoặc *C. capsularis*, có chứa phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm có:

- a) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng; và
- b) phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5, hoặc dạng bổ sung của chúng.

2. Polynucleotit được phân lập mã hóa theo điểm 1, trong đó cây trồng *C. olitorius* là giống O-4.

3. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó cây trồng *C. capsularis* là giống CVL-1.

4. Polypeptit homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL được phân lập bao gồm trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm:

- (a) trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của chúng;
- (b) trình tự axit amin bao gồm trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc 6; polypeptit này có chức năng được chọn từ nhóm gồm có xúc tác cho sự khởi đầu, sự tạo thành, sự tăng cường, và sự thay đổi, để bằng cách đó cải biến hợp phần của sợi libe ở cây trồng *C. olitorius* hoặc *C. capsularis*.

5. Polypeptit được phân lập theo điểm 4, trong đó cây trồng *C. olitorius* là giống O-4.

6. Polypeptit được phân lập theo điểm 4, trong đó cây trồng *C. capsularis* là giống CVL-1.

7. Cấu trúc gen tái tổ hợp bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm bất kỳ từ 1 đến 3, trong đó polynucleotit có thể biểu hiện được ở tế bào chủ để sản xuất thể tương đồng của polypeptit homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL ở cây trồng *C. olitorius* và *C. capsularis*.

8. Cấu trúc gen tái tổ hợp theo điểm 7, trong đó cấu trúc gen này còn bao gồm vùng trình tự mở đầu được liên kết có điều khiển với phân tử axit nucleic được nêu ở a) hoặc b), trong đó trình tự mở đầu này làm tăng cường sự phiên mã hoặc sự biểu hiện của phân tử axit nucleic.

9. Thể biến nạp có chứa cấu trúc gen tái tổ hợp theo điểm 7 có khả năng biểu hiện polynucleotit, trong đó thể biến nạp này sản xuất thể tương đồng của polypeptit homeobox 4 liên quan đến WUSCHEL.

10. Phương pháp sản xuất cây trồng hoặc cây trồng chuyển gen có năng suất sợi được làm tăng hoặc được tăng cường so với cây trồng đối chứng, bao gồm:

- a) đưa vào tế bào thực vật cấu trúc gen tái tổ hợp bao gồm polynucleotit theo điểm 7; và
- b) cấy tế bào thực vật trong điều kiện để thúc đẩy sự sinh trưởng và sự phát triển của cây trồng; và
- c) biểu hiện polypeptit được chọn từ nhóm gồm có:
 - i) polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6, hoặc mảnh có hoạt tính sinh học của chúng; và
 - ii) polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6.

11. Polynucleotit được phân lập theo điểm 1, trong đó polynucleotit này có độ tương đồng trình tự ít nhất là 98% so với trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 5.

12. Polypeptit được phân lập theo điểm 4, trong đó polypeptit này có độ tương đồng trình tự ít nhất là 98% so với trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 6.

13. Hạt từ thể biến nạp theo điểm 9, trong đó hạt này bao gồm polynucleotit được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-3 và 11.

14. Phương pháp làm cảm ứng, làm khởi đầu, cải thiện, hoặc làm tăng sự sinh trưởng cây, chiều cao cây, năng suất sợi và hạt trong cây đay, bao gồm việc đưa vào cây đay cấu trúc gen tái tổ hợp theo điểm 8.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BANGLADESH JUTE RESEARCH INSTITUTE

<120> POLYNUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA POLYPEPTIT HOMEBOX 4 LIÊN QUAN ĐẾN WUSCHEL (WOX4) VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN CÓ NĂNG SUẤT SỢI ĐƯỢC TĂNG CƯỜNG

<130> JGX-008.25

<140> PCT/US2014/066599

<141> 2014-11-20

<150> 61/907,617

<151> 2013-11-22

<160> 12

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1250

<212> ADN

<213> *Corchorus olitorius*

<400> 1

acatcatcat ttggtcttgg ttcttcaaag caccacctca tatcccactt tctttttctt	60
ttcttttttt taaaattttt attttttggg ttaaatttat ttttgttatt atataatcag	120
agcattctcc ccatcattca ctcttccacc atgggaaaca tgaaggtgca tcagttggca	180
cgtggcttat gggagcatga accctccctc tcccttggtt gcaagcgctt acgccctctt	240
gctcccaagc tccacccttc ctcttcccct gatcatactt ccgtctcctc tttcgacctt	300
aagaccttca ttcgtcccgga aagtggcccc cgaaaacttt gcccttctga cgacaagcga	360
gattctcatt ctccccaggt acttaciaat atccatgaaa tgaaaccctt ttatttttcc	420
aatgatgtat ataattagt ggggaaggata agattttgaa cttacgatga acaataacag	480
tgtggaaagt tgataatcaa aggttaagaa tgtgaagctg aaactttttt cttttttttg	540
gttatgtagg tggaaacgca ccagggggga acgcggtgga atccgacgca agagcagata	600
gggatatttg agatgctgta tagagggtgg atgcgaactc caaatgcaca gcaaatagaa	660
cagatcactg cacagttagg caagtacggg aagatcgaag gcaaaaacgt tttctatttg	720
ttccaaaacc acaaagcacg cgaaaggcaa aagcagaagc gtaacagtct tggctcttagc	780
cattctccca gaaactctgc tcccattacc accataactt tggactctag ggtaagttca	840
aaccaacaaa acccttttct tgtatatata taacggttag ttttttagtt ttacttttta	900
taaacagcaa ttaacattaa tgtttttgtt tatatatata gggggaagta atggagagag	960
aggaggatag tccatataag agaaagtgta ggagctgggc atttgagtag ttagaagaag	1020

aaagcagatc atcatcgtcg agtcaagagg aggaaaacag aactctggag cttttcccat 1080
 tgcacccgga aggcagatga tggacgtttc aactttgaaa aacaaggaaa aagggaagct 1140
 taacccaaaa ccaaaaagac tgctacaaaa cccaaaactc tgttcccatt tatgaaatga 1200
 taaacatatg ctttgatgat ccatgatgat gatgatgata atgaagctga 1250

<210> 2
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> *Corchorus olitorius*

<400> 2
 atgggaaaca tgaaggtgca tcagttggca cgtggcttat gggagcatga accctccctc 60
 tcccttggtt gcaagcgctt acgccctctt gctcccaagc tccacccttc ctcttcccct 120
 gatcatactt ccgtctcttc tttcgacctt aagaccttca ttcgtcccga aagtggcccc 180
 cgaaaacttt gcccttctga cgacaagcga gattctcatt ctccccaggt ggaaacgcac 240
 ccagggggaa cgcggtggaa tccgacgcaa gagcagatag ggatattgga gatgctgtat 300
 agaggtggga tgcgaactcc aaatgcacag caaatagaac agatcactgc acagttaggc 360
 aagtacggga agatcgaagg caaaaacgtt ttctattggt tccaaaacca caaagcacgc 420
 gaaaggcaaa agcagaagcg taacagtctt ggtcttagcc attctcccag aaactctgct 480
 cccattacca ccataacttt ggactctagg ggggaagtaa tggagagaga ggaggatagt 540
 ccatataaga gaaagtgtag gagctgggtc tttgagtact tagaagaaga aagcagatca 600
 tcatcgtcga gtcaagagga ggaaaacaga actctggagc ttttcccatt gcacccggaa 660
 ggcagatga 669

<210> 3
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Corchorus olitorius*

<400> 3
 Met Gly Asn Met Lys Val His Gln Leu Ala Arg Gly Leu Trp Glu His
 1 5 10 15
 Glu Pro Ser Leu Ser Leu Gly Cys Lys Arg Leu Arg Pro Leu Ala Pro
 20 25 30
 Lys Leu His Pro Ser Ser Ser Pro Asp His Thr Ser Val Ser Ser Phe
 35 40 45
 Asp Leu Lys Thr Phe Ile Arg Pro Glu Ser Gly Pro Arg Lys Leu Cys
 50 55 60

30380

Pro Ser Asp Asp Lys Arg Asp Ser His Ser Pro Gln Val Glu Thr His
65 70 75 80

Pro Gly Gly Thr Arg Trp Asn Pro Thr Gln Glu Gln Ile Gly Ile Leu
85 90 95

Glu Met Leu Tyr Arg Gly Gly Met Arg Thr Pro Asn Ala Gln Gln Ile
100 105 110

Glu Gln Ile Thr Ala Gln Leu Gly Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Gly Lys
115 120 125

Asn Val Phe Tyr Trp Phe Gln Asn His Lys Ala Arg Glu Arg Gln Lys
130 135 140

Gln Lys Arg Asn Ser Leu Gly Leu Ser His Ser Pro Arg Asn Ser Ala
145 150 155 160

Pro Ile Thr Thr Ile Thr Leu Asp Ser Arg Gly Glu Val Met Glu Arg
165 170 175

Glu Glu Asp Ser Pro Tyr Lys Arg Lys Cys Arg Ser Trp Ser Phe Glu
180 185 190

Tyr Leu Glu Glu Glu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu
195 200 205

Asn Arg Thr Leu Glu Leu Phe Pro Leu His Pro Glu Gly Arg
210 215 220

<210> 4

<211> 1237

<212>ADN

<213> Corchorus capsularis

<400> 4

tcacaagtca acctcacctc atcatttggt cttggttctt caaagcacca cctcatatcc	60
cacttccttt ttcaattttt aatttttttt ggggttaa atatttggtt atataatcag	120
agcattctcc ccatcattca ctcttcacc atgggaaaca tgaaggtgca tcagttggca	180
cgtggcttat gggagcatga accctccctc tcccttggtt gcaagcgctt acgccctctt	240
gctcccaagc tccacccttc ctcttcccct gatcatactt ccgtctcctc tttcgacctt	300
aagaccttca ttcgtcccgga aagtggcccc cggaacttt gcccttctga cgacaagcga	360
gattctcatt ctgccaggt acttaaaaat taatatccat gaaataattt gtggggaagg	420
ataagttttg aacttaatgc ataataacag tgtggaaact taatagggtta agaataattg	480
aagaacttct atatatatga agctgaaact tttttgtggt gttgtaggtg gaaacgcacc	540

cagggggaac gcggtggaat ccgacgcaag agcagatagg gatactggag atgctgtata 600
 gaggtgggat gcgaactcca aatgcacagc aaatagaaca gatcactgca cagctaggca 660
 agtacggcaa gatcgaaggc aaaaacgttt tctattgggt ccaaaaccac aaagcacgcg 720
 aaaggcaaaa gcagaagcgt aacagtcttg gtcttagcca ttctcccaga aactcagctc 780
 ccattaccac tataactttg gacactaggg taagttcaaa ccaacaaaac cttttctgtg 840
 tatatatata tataacggtt agtttttagt ttttacttct tataaacaga gaaaattaac 900
 aatgtttgtg tttatatata tataggggga agtaatggaa agagaggagg atagtccata 960
 taagagaaag tgtaggagct ggtcttttga gtacttagaa gaagaaagca gatcatcatc 1020
 gtcgagtcaa gaggaggaaa acagaactct ggagcttttc ccattgcacc cggaaggcag 1080
 atcatgaagg gggtttcaac tttcaacttt caactttcaa ctttcaaaat gaagggaaaa 1140
 gggaagctta acccaaaacc aaaaagactg ctacaaaacc caaaactctg ttcccattta 1200
 tgaaatgata aacttatgct ttgatgatcg atccatg 1237

<210> 5

<211> 672

<212>ADN

<213> Corchorus capsularis

<400> 5

atgggaaaca tgaagggtgca tcagttggca cgtggcttat gggagcatga accctccctc 60
 tcccttggtt gcaagcgctt acgccctctt gctccaagc tccacccttc ctcttccctt 120
 gatcatactt ccgtctcttc tttcgacctt aagaccttca ttcgtcccga aagtggcccc 180
 cggaaacttt gcccttctga cgacaagcga gattctcatt ctgccagggt ggaaacgcac 240
 ccagggggaa cgcggtggaa tccgacgcaa gagcagatag ggatactgga gatgctgtat 300
 agaggtggga tgcgaactcc aatgcacag caaatagaac agatcactgc acagctaggc 360
 aagtacggca agatcgaagg caaaaacgtt ttctattggt tccaaaacca caaagcacgc 420
 gaaaggcaaa agcagaagcg taacagtctt ggtcttagcc attctcccag aaactcagct 480
 cccattacca ctataacttt ggacactagg ggggaagtaa tggaaagaga ggaggatagt 540
 ccatataaga gaaagtgtag gagctgggtct tttgagtact tagaagaaga aagcagatca 600
 tcatcgtcga gtcaagagga ggaaaacaga actctggagc ttttccatt gcacccggaa 660
 ggcagatcat ga
 672

<210> 6

<211> 223

<212> PRT

<213> Corchorus capsularis

30380

<400> 6

Met Gly Asn Met Lys Val His Gln Leu Ala Arg Gly Leu Trp Glu His
1 5 10 15

Glu Pro Ser Leu Ser Leu Gly Cys Lys Arg Leu Arg Pro Leu Ala Pro
20 25 30

Lys Leu His Pro Ser Ser Ser Pro Asp His Thr Ser Val Ser Ser Phe
35 40 45

Asp Leu Lys Thr Phe Ile Arg Pro Glu Ser Gly Pro Arg Lys Leu Cys
50 55 60

Pro Ser Asp Asp Lys Arg Asp Ser His Ser Arg Gln Val Glu Thr His
65 70 75 80

Pro Gly Gly Thr Arg Trp Asn Pro Thr Gln Glu Gln Ile Gly Ile Leu
85 90 95

Glu Met Leu Tyr Arg Gly Gly Met Arg Thr Pro Asn Ala Gln Gln Ile
100 105 110

Glu Gln Ile Thr Ala Gln Leu Gly Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Gly Lys
115 120 125

Asn Val Phe Tyr Trp Phe Gln Asn His Lys Ala Arg Glu Arg Gln Lys
130 135 140

Gln Lys Arg Asn Ser Leu Gly Leu Ser His Ser Pro Arg Asn Ser Ala
145 150 155 160

Pro Ile Thr Thr Ile Thr Leu Asp Thr Arg Gly Glu Val Met Glu Arg
165 170 175

Glu Glu Asp Ser Pro Tyr Lys Arg Lys Cys Arg Ser Trp Ser Phe Glu
180 185 190

Tyr Leu Glu Glu Glu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu
195 200 205

Asn Arg Thr Leu Glu Leu Phe Pro Leu His Pro Glu Gly Arg Ser
210 215 220

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Chưa biết

<220>

<223>Mô tả đối tượng chưa biết: peptit miền đầu tận C WUSCHEL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Glu hoặc Arg

<400> 7

Xaa Thr Leu Pro Leu Phe Pro

1

5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213>Chưa biết

<220>

<223>Mô tả đối tượng chưa biết: peptit miền đầu tận C WUSCHEL

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Ala hoặc Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ser hoặc Thr

<400> 8

Ala Xaa Leu Glu Leu Xaa Leu

1

5

<210> 9

<211> 21

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi tổng hợp

<400> 9

ccatgggaaa catgaaggtg c

21

<210> 10

<211> 21

<212>ADN

<213>Trình tự nhân tạo

<220>

<223>Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi tổng hợp

<400> 10

tgaacgtcc atcatctgcc t

21

<210> 11
 <211> 21
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi tổng hợp

<400> 11
 ccatgggaaa catgaaggtg c

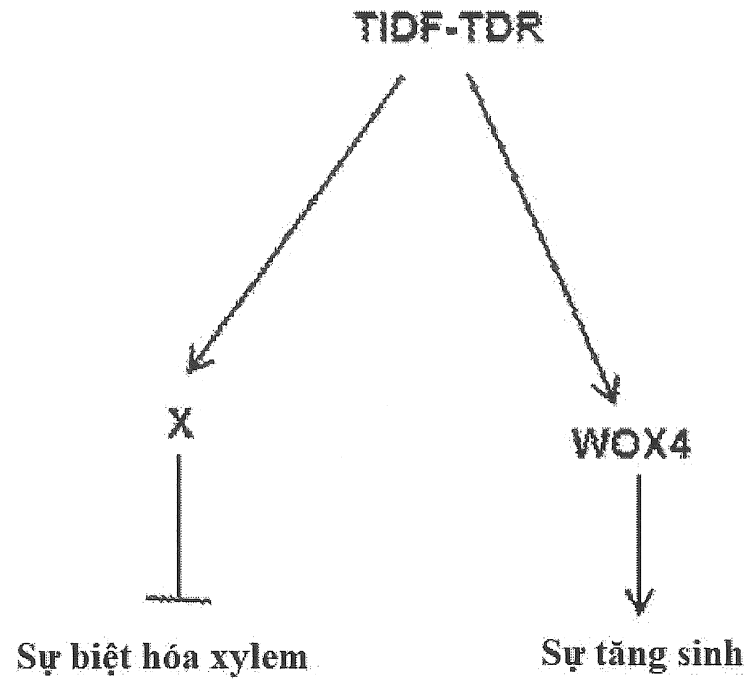
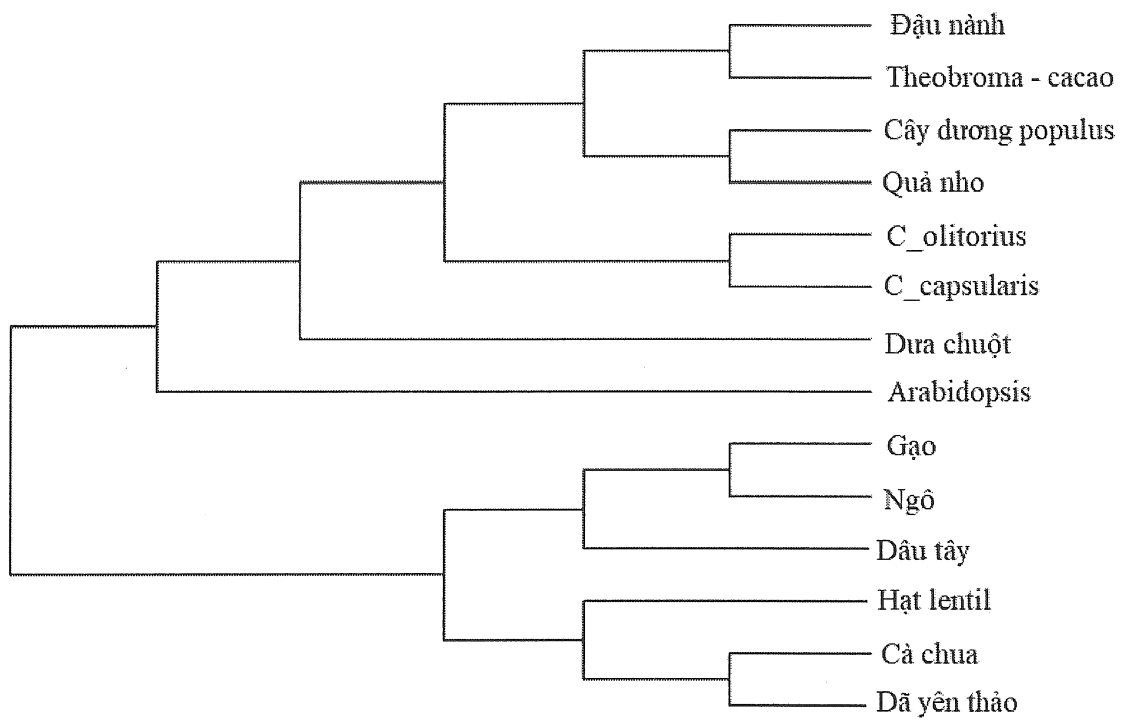
21

<210> 12
 <211> 20
 <212>ADN
 <213>Trình tự nhân tạo

<220>
 <223>Mô tả trình tự nhân tạo: đoạn mỗi tổng hợp

<400> 12
 ttcattgatct gccttcggg

20

**Fig.1****Fig. 2**