



(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)



1-0031089

(51)⁷ C12N 15/11; A01H 1/02; A01H 5/00; (13) B
A01N 47/44; A01P 7/04; A01G 7/06;
C12N 15/32; C12N 15/54; C12N 15/82;
C12N 5/10; C12Q 1/68

(21) 1-2017-04735

(22) 28/04/2016

(86) PCT/CN2016/080542 28/04/2016

(87) WO 2016/173508 A1 03/11/2016

(30) 201510219911.8 30/04/2015 CN

(45) 25/02/2022 407

(43) 26/02/2018 359A

(73) BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

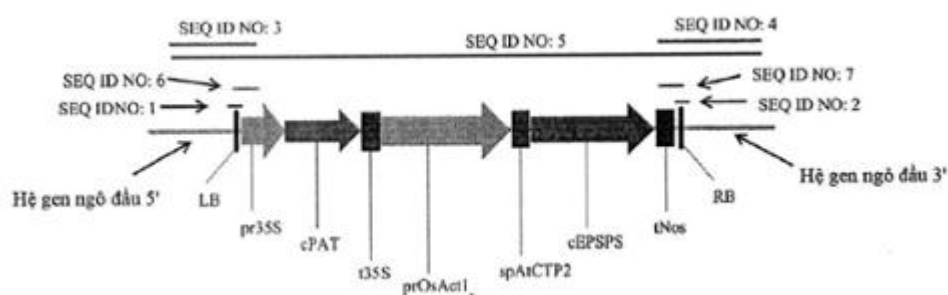
No.49 Building, Institute for Application of Atomic Energy, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.2 Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, P.R. China

(72) KANG, Yuejing (CN); GUO, Mingxin (CN); LIU, Haili (CN); ZHANG, Chengwei (CN); DING, Derong (CN); JIAO, Guowei (CN); WEI, Xuesong (CN); TANG, Bo (CN); XIA, Zuling (CN); XIONG, Guanjuan (CN); XU, Liang (CN); BAO, Xiaoming (US).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC ĐỂ PHÁT HIỆN NGÔ CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ DBN9858, PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN NGÔ NÀY VÀ BỘ KIT PHÁT HIỆN ADN

(57) Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic để phát hiện ngô chịu được thuốc diệt cỏ DBN9858, phương pháp phát hiện ngô nêu trên, và bộ kit phát hiện ADN.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic để phát hiện ngô chịu được thuốc diệt cỏ DBN9858 và phương pháp phát hiện ngô nêu trên và cụ thể, sáng chế đề cập đến ngô DBN9858 chịu được glyphosat và glufosinat và phương pháp phát hiện xem mẫu sinh học có chứa phân tử ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen đặc trưng DBN9858 hay không.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

N-phosphonometylglyxin, còn được gọi là glyphosat, là thuốc diệt cỏ hoán vị, bám sâu, phổ rộng và triệt sinh. Glyphosat là chất ức chế cạnh tranh của phosphoenolpyruvat (EPS) mà đây là một chất nền tổng hợp của hợp chất 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSPS), và có thể ức chế sự chuyển hóa của cả chất nền, PEP và 3-phosphoshikimat thành hợp chất 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphoshikimat với sự xúc tác của EPSPS, do đó phong bế con đường tổng hợp của axit shikimic mà nó là tiền chất tổng hợp axit amin thơm, và làm rối loạn quá trình tổng hợp protein để gây ra cái chết cho thực vật và vi khuẩn.

Khả năng chịu glyphosat có thể được thực hiện nhờ sự biểu hiện của *EPSPS* cải biến. *EPSPS* cải biến thể hiện ái lực ít đối với glyphosat. Do đó, với sự có mặt của glyphosat, *EPSPS* duy trì được hoạt tính xúc tác của nó, tức là, có được khả năng chịu glyphosat.

Ngô (*Zea mays L.*) là cây lương thực chính ở nhiều vùng trên thế giới. Trong quá trình sản xuất ngô, khả năng chịu thuốc diệt cỏ, đặc biệt là khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat, là một tính trạng nông học quan trọng. Khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat của ngô có thể thu được nhờ sự biểu hiện của gen chịu glyphosat (*EPSPS*, *CP4*) ở ngô thông qua phương pháp chuyển gen, chẳng hạn, ngô mang sự kiện NK603, ngô mang sự kiện MON88017 và tương tự.

Gần đây, việc áp dụng rộng rãi hệ thống trồng chịu glyphosat và việc sử dụng glyphosat gia tăng đã dẫn đến sự lan rộng của các loại cỏ kháng glyphosat. Khi đương đầu với các loại cỏ kháng glyphosat hoặc những vùng được chuyển

đổi thành những vùng mà việc kiểm soát các loài cỏ ở đó trở nên khó khăn hơn, người trồng cây có thể bù đắp cho nhược điểm của glyphosat bằng cách kết hợp với hoặc theo cách khác, sử dụng thuốc diệt cỏ khác có khả năng kiểm soát được các loại cỏ bỏ sót.

Glufosinat là thuốc diệt cỏ không hệ thống, không chọn lọc trong số thuốc diệt cỏ phosphinothrixin. Thuốc này chủ yếu được sử dụng để kiểm soát sau khi nhú đối với cỏ lá rộng thường niên hoặc lâu năm, thuốc diệt cỏ này kiểm soát cỏ bằng cách ức chế không thể đảo ngược đối với L-phosphinothrixin (thành phần hoạt tính trong glufosinat) trên men glutamin syntaza (một enzym cần thiết để khử độc amoniac ở thực vật). Khác với glyphosat mà nó sẽ tiêu diệt rễ, glufosinat ưu tiên tiêu diệt lá và có thể được vận chuyển bên trong mô thực vật thông qua sự thoát hơi nước ở thực vật và có tác dụng nhanh giữa paraquat và glyphosat.

Enzym phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) phân lập từ *Streptomyces* xúc tác cho sự chuyển hóa L-phosphinothrixin thành dạng bất hoạt của nó bằng quá trình axetyl hóa. Một gen ở dạng tối ưu hóa trên thực vật biểu hiện PAT đã được sử dụng trong đậu tương để truyền cho đậu tương khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat, chẳng hạn, đậu tương mang sự kiện A5547-127. Do đó, thuốc diệt cỏ glufosinat được sử dụng kết hợp với tính trạng chịu glufosinat có thể là phương tiện không chọn lọc để quản lý hiệu quả cỏ kháng glufosinat.

Trong khi đó, với việc canh tác trên phạm vi rộng của ngô chuyển gen kháng côn trùng, một lượng nhỏ của côn trùng/động vật gây hại sống sót có thể phát triển tính kháng sau khi nhân giống trong nhiều thế hệ. Đối với ngô chuyển gen không kháng côn trùng, ngô chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ được trồng cùng với ngô chuyển gen kháng côn trùng theo một tỷ lệ nhất định có thể làm chậm sự phát triển tính kháng ở côn trùng/động vật gây hại.

Đã biết rằng, sự biểu hiện của các gen ngoại sinh bên trong thực vật bị ảnh hưởng bởi vị trí của chúng trong các nhiễm sắc thể mà có thể do bởi thực tiễn rằng, cấu trúc chất nhiễm sắc (như chất dị nhiễm sắc) hoặc yếu tố điều hòa phiên mã (như yếu tố tăng cường) ở sát với vị trí gắn. Do đó, thông thường cần phải sàng lọc một số lượng lớn các sự kiện để nhận diện một sự kiện mà có thể

được đưa ra thị trường (tức là, một sự kiện trong đó, gen đưa vào mong muốn tạo ra được sự biểu hiện tối ưu). Chẳng hạn, đã quan sát được ở thực vật và các sinh vật khác thấy rằng, lượng biểu hiện của gen đưa vào thay đổi nhiều giữa một sự kiện này so với một sự kiện khác; tương tự, có thể có sự khác nhau về các đặc trưng không gian và thời gian của sự biểu hiện, chẳng hạn, sự khác nhau về sự biểu hiện tương đối của gen chuyển ở các mô thực vật khác nhau, sự khác nhau này được biểu hiện ở chỗ, mô hình biểu hiện thực tiễn có thể khác với mô hình biểu hiện được kỳ vọng theo yếu tố điều hòa phiên mã trong cấu trúc được đưa vào với gen. Do đó, thông thường cần phải tạo ra hàng trăm sự kiện khác nhau và sàng lọc một sự kiện duy nhất có lượng biểu hiện và mô hình biểu hiện kỳ vọng của gen chuyển nhằm mục đích thương mại hóa từ các sự kiện này. sự kiện có lượng biểu hiện và mô hình biểu hiện kỳ vọng của gen chuyển có thể được sử dụng để thẩm gen chuyển vào trong các cơ sở di truyền khác thông qua lai chéo giới tính bằng một phương pháp chọn giống thông thường. Thế hệ con được tạo ra bằng phương thức lai như vậy vẫn duy trì được đặc điểm biểu hiện gen chuyển ở thể biến nạp ban đầu. Với mô hình chiến lược này, có thể đảm bảo rằng, nhiều giống có sự biểu hiện gen đáng tin cậy và những giống này có thể thích ứng với các điều kiện sinh trưởng tại chỗ.

Tốt hơn là có thể phát hiện được sự có mặt của một sự kiện đặc trưng để xác định xem, liệu thế hệ con lai chéo giới tính có chứa một gen mong muốn hay không. Ngoài ra, phương pháp phát hiện sự kiện đặc trưng cũng sẽ có ích trong việc tuân theo các quy định thích hợp, chẳng hạn, thực phẩm nguồn gốc từ cây trồng tái tổ hợp đòi hỏi cần phải được chấp thuận chính thức và dán nhãn trước khi đưa ra thị trường. Có thể phát hiện sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp phát hiện polynucleotit đã biết bất kỳ như phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc phương pháp lai ADN sử dụng các đoạn dò polynucleotit. Các phương pháp phát hiện này thường tập trung vào các yếu tố di truyền được sử dụng thường xuyên, như đoạn khởi đầu, gen kết thúc, gen chỉ thị, v.v.. Vì vậy, các phương pháp này không thể hữu ích để phân biệt rõ ràng các sự kiện khác nhau, đặc biệt là các sự kiện được tạo ra sử dụng cùng cấu trúc ADN, trừ khi trình tự của ADN nhiễm sắc thể (“ADN chẵn”) liên kết với ADN gen chuyển đưa vào là đã biết. Do đó, hiện nay, sự kiện đặc trưng của gen

chuyển thường được nhận dạng bằng phương pháp PCR với cặp đoạn mỗi nối điểm nối giữa gen chuyển xen vào và ADN chặn, và đặc biệt là đoạn mỗi thứ nhất bao gồm trình tự chặn và đoạn mỗi thứ hai bao gồm trình tự xen vào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến trình tự axit nucleic để phát hiện ngô chịu thuốc diệt cỏ DBN9858 và phương pháp phát hiện trình tự nêu trên, trong đó ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat tốt hơn, và phương pháp phát hiện có thể nhận dạng một cách chính xác và nhanh chóng xem mẫu sinh học có chứa phân tử ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen đặc trưng DBN9858 hay không.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic bao gồm ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Tốt hơn, trình tự axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, trình tự axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, trình tự axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó.

SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có độ dài 22 nucleotit nằm gần điểm nối xen vào tại đầu 5' của trình tự xen vào ở ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và bắc qua trình tự ADN hệ gen chặn tại vị trí xen vào và trình tự ADN tại đầu 5' của trình tự xen vào. Sự bao gồm của SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được nhận dạng là sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có độ dài 22 nucleotit nằm gần điểm nối xen vào tại đầu 3' của trình tự xen vào ở ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và bắc qua trình tự ADN hệ gen chặn tại vị trí xen vào và trình tự ADN tại đầu 3' của trình tự xen vào. Sự bao gồm của SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được nhận dạng là sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Theo sáng chế, trình tự axit nucleic có thể là ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11

nucleotit liên tục ở phần bất kỳ của trình tự xen chuyển gen trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó (trình tự axit nucleic thứ nhất), hoặc ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 nucleotit liên tục ở phần bất kỳ của vùng ADN hệ gen ngô chặn đầu 5' trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó (trình tự axit nucleic thứ hai). Trình tự axit nucleic còn có thể là phần tương đồng hoặc hỗ trợ cho SEQ ID NO: 3 bao gồm SEQ ID NO: 1 đầy đủ. Khi trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được sử dụng cùng nhau, các trình tự axit nucleic này có thể được sử dụng làm cặp đoạn mồi ADN trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra sản phẩm khuếch đại. Khi sản phẩm khuếch đại được tạo ra trong phương pháp khuếch đại ADN sử dụng cặp đoạn mồi ADN là sản phẩm khuếch đại bao gồm SEQ ID NO: 1, sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thể hệ con của nó có thể được chẩn đoán. Như đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực, các trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai không nhất thiết chỉ bao gồm ADN, và có thể bao gồm ARN, hỗn hợp của ADN và ARN, hoặc tổ hợp của ADN, ARN hoặc các nucleotit khác hoặc các yếu tố tương tự của nó mà không hoạt động ở dạng các khuôn của một hoặc nhiều polymeraza. Ngoài ra, đoạn dò hoặc đoạn mồi theo sáng chế cần có chiều dài ít nhất khoảng 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, hoặc 22 nucleotit liên tục, và có thể được lựa chọn từ các trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5. Khi đoạn dò và đoạn mồi được lựa chọn từ các trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5, chúng có thể có chiều dài ít nhất khoảng từ 21 đến 50 hoặc nhiều hơn 50 nucleotit liên tục. SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có độ dài 1301 nucleotit nằm gần điểm nối xen vào tại đầu 5' của trình tự xen vào ở ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó bao gồm trình tự ADN hệ gen chặn của ngô có chiều dài 1301 nucleotit (các nucleotit 1-1067 trong SEQ ID NO: 3), trình tự ADN cấu trúc DBN10006 có chiều dài 89 nucleotit (các nucleotit 1068-1156 trong SEQ ID NO: 3) và trình tự ADN đầu 5' của gen khởi điểm pr35S có chiều dài 145 nucleotit (các nucleotit 1157-1301 trong SEQ ID NO: 3). Sự bao gồm của SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được nhận dạng là sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Trình tự axit nucleic có thể ít nhất là 11 hoặc nhiều hơn 11 nucleotit liên tục ở phần bất kỳ của trình tự xen chuyển gen trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó (trình tự axit nucleic thứ ba), hoặc ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 nucleotit liên tục ở phần bất kỳ của vùng ADN hệ gen ngô chặn đầu 3' trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó (trình tự axit nucleic thứ tư). Trình tự axit nucleic còn có thể là phần tương đồng hoặc bù vào SEQ ID NO: 4 bao gồm SEQ ID NO: 2 đầy đủ. Khi trình tự axit nucleic thứ ba và trình tự axit nucleic thứ tư được sử dụng cùng nhau, các trình tự axit nucleic này có thể được sử dụng làm cặp đoạn mỗi ADN trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra sản phẩm khuếch đại. Khi sản phẩm khuếch đại được tạo ra trong phương pháp khuếch đại ADN sử dụng cặp đoạn mỗi ADN là sản phẩm khuếch đại bao gồm SEQ ID NO: 2, sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thế hệ con của nó có thể được chẩn đoán. SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có độ dài 1310 nucleotit nằm gần điểm nối xen vào tại đầu 3' của trình tự xen vào ở ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó bao gồm trình tự kết thúc tNos có 164 nucleotit (các nucleotit 1-164 trong SEQ ID NO: 4), trình tự ADN cấu trúc DBN10006 có 84 nucleotit (các nucleotit 165-248 trong SEQ ID NO: 4) và trình tự ADN hệ gen chặn có 1062 nucleotit tại vị trí gần của ngô (các nucleotit 249-1301 trong SEQ ID NO: 4). Sự bao gồm của SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được nhận dạng là sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có độ dài 6890 nucleotit để mô tả đặc trưng ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và cụ thể bao gồm các hệ gen và các yếu tố di truyền như được thể hiện trong bảng 1. Sự bao gồm của SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được nhận dạng là sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Bảng 1. Các hệ gen và các yếu tố di truyền được bao gồm trong SEQ ID NO: 5

Các yếu tố di truyền /Các hệ gen	Độ dài (bp)	Vị trí trong SEQ ID NO: 5
Hệ gen đầu 5'	1067	1-1067
LB	89	1068-1156
pr35S	530	1157-1686
cPAT	552	1706-2257
t35S	195	2279-2473
prOsAct1	1411	2479-3889
spAtCTP2	228	3890-4117
cEPSPS	1368	4118-5485
tNos	253	5492-5744
RB	84	5745-5828
Hệ gen đầu 3'	1062	5829-6890

Trình tự axit nucleic hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra một amplicon mà nó được phát hiện để chẩn đoán phát hiện sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thể hệ con của nó trong mẫu sinh học; và trình tự axit nucleic hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được sử dụng trong phương pháp phát hiện nucleotit, để phát hiện sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thể hệ con của nó trong mẫu sinh học.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu, bao gồm:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với ít nhất hai đoạn môi trong phản ứng khuếch đại axit nucleic;

tiến hành phản ứng khuếch đại axit nucleic; và

phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại;

trong đó, sản phẩm khuếch đại bao gồm ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, sản phẩm khuếch đại bao gồm các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó,

hoặc các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, sản phẩm khuếch đại bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Trong các giải pháp kỹ thuật nêu trên, các đoạn mỗi bao gồm ít nhất một trong số các trình tự axit nucleic.

Cụ thể, đoạn mỗi bao gồm đoạn mỗi thứ nhất được lựa chọn từ SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 10, và đoạn mỗi thứ hai được lựa chọn từ SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 11.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập thêm đến phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu, bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với đoạn dò bao gồm ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó;

tiến hành lai mẫu cần được phát hiện với các đoạn dò trong điều kiện lai nghiêm ngặt; và

phát hiện sự lai của mẫu cần được phát hiện với đoạn dò.

Điều kiện nghiêm ngặt có thể là sự lai trong dung dịch của 6 x SSC (natri xitrat), SDS 0,5% (natri dodecyl sulfat) ở nhiệt độ 65°C, tiếp theo rửa màng lần lượt với 2 x SSC, SDS 0,1%, và 1 x SSC, SDS 0,1% một lần.

Ngoài ra, đoạn dò bao gồm các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1, hoặc các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 2.

Ngoài ra, đoạn dò có SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế còn đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu, bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với các phân tử axit nucleic đánh dấu bao gồm ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc ít nhất 11 nucleotit liên tục trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó;

tiến hành lai mẫu cần được phát hiện với các phân tử axit nucleic đánh dấu trong điều kiện lai nghiêm ngặt; và

phát hiện sự lai của mẫu cần được phát hiện và các phân tử axit nucleic đánh dấu, để xác định liệu khả năng chịu được glyphosat và/hoặc khả năng chịu được glufosinat có liên quan đến các phân tử axit nucleic đánh dấu hay không bằng phương pháp phân tích chọn giống nhờ chỉ thị phân tử.

Ngoài ra, các phân tử axit nucleic đánh dấu bao gồm các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1, hoặc các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 2.

Ngoài ra, các phân tử axit nucleic đánh dấu có SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Một cách tùy ý, ít nhất một trong số các đoạn dò được đánh dấu bằng ít nhất một nhóm huỳnh quang.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế còn đề cập đến bộ kit phát hiện ADN bao gồm ít nhất phân tử ADN mà bao gồm ít nhất 11 nucleotit liên tục trong trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc ít nhất 11 nucleotit liên tục trong trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó, và hữu ích làm đoạn mồi hoặc đoạn dò ADN đặc hiệu đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thể hệ con của nó.

Ngoài ra, phân tử ADN bao gồm các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc các nucleotit liên tục tại các vị trí 1-11 hoặc tại các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, phân tử ADN có trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề cập đến tế bào thực vật bao gồm: trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS chịu được glyphosat, trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT chịu được glufosinat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu chứa trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat, bao gồm bước: đưa trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS chịu được glyphosat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu vào trong hệ gen của cây ngô, trong đó trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu ít nhất là một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Cụ thể, phương pháp tạo ra ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat bao gồm các bước:

tiến hành lai dựa trên giới tính ngô gốc thứ nhất của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat với ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat, để tạo ra nhiều thực vật thế hệ con;

tiến hành xử lý thực vật thế hệ con bằng thuốc diệt cỏ glyphosat; và

lựa chọn thực vật thế hệ con có khả năng chịu glyphosat.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế tiếp tục đề cập đến phương pháp tạo ra ngô có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat, bao gồm bước: đưa trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT chịu glufosinat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu vào trong hệ gen của cây ngô, trong đó trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu ít nhất là một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Cụ thể, phương pháp tạo ra ngô có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm các bước:

tiến hành lai dựa trên giới tính ngô gốc thứ nhất của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat với ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat, để tạo ra nhiều thực

vật thể hệ con;

tiến hành xử lý thực vật thể hệ con bằng thuốc diệt cỏ glufosinat; và
lựa chọn thực vật thể hệ con có khả năng chịu được glufosinat.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập thêm đến phương pháp tạo ra ngô có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat, bao gồm bước đưa trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS chịu glyphosat, trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT chịu glufosinat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu vào trong hệ gen của cây ngô, trong đó trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu ít nhất là một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Cụ thể, phương pháp tạo ra ngô có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm các bước:

tiến hành lai dựa trên giới tính ngô gốc thứ nhất của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat với ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, để tạo ra nhiều thực vật thể hệ con;

tiến hành xử lý thực vật thể hệ con bằng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat; và

lựa chọn thực vật thể hệ con có khả năng chịu glyphosat và glufosinat.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế đề cập thêm đến phương pháp canh tác ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat, bao gồm các bước:

tiến hành trồng ít nhất một hạt ngô mà hạt này bao gồm trong hệ gen của nó trình tự axit nucleic mã hóa EPSPS chịu glyphosat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu;

để cho hạt ngô phát triển thành cây ngô;

phun lên cây ngô một lượng hiệu quả của thuốc diệt cỏ glyphosat, và thu lấy cây có mức độ tổn hại thực vật giảm thiểu so với các cây khác không có trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu;

trong đó, trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu ít nhất là một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp canh tác cây ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat, bao gồm các bước:

tiến hành trồng ít nhất một hạt ngô mà hạt này bao gồm trong hệ gen của nó trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT chịu được glufosinat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu;

để cho hạt ngô phát triển thành cây ngô;

phun lên cây ngô một lượng hiệu quả của thuốc diệt cỏ glufosinat, và thu lấy cây có mức độ tổn hại thực vật giảm thiểu so với các cây khác không có trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu;

trong đó, trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu ít nhất là một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp canh tác cây ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat, bao gồm các bước:

tiến hành trồng ít nhất một hạt ngô mà hạt này bao gồm trong hệ gen của nó trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS chịu được glyphosat, trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT chịu được glufosinat và trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu;

để cho hạt ngô phát triển thành cây ngô;

phun lên cây ngô một lượng hiệu quả của thuốc diệt cỏ glufosinat và thuốc diệt cỏ glyphosat, và thu lấy cây có mức độ tổn hại thực vật giảm thiểu so với các cây khác không có trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu;

trong đó, trình tự axit nucleic tại vùng đặc hiệu ít nhất là một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế còn đề cập đến phương pháp bảo

vệ thực vật tránh được các tổn hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ, bao gồm việc áp dụng thuốc diệt cỏ chứa lượng hiệu quả của glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng mà ít nhất một ngô chuyển gen được trồng trên cánh đồng này, trong đó cây ngô chuyển gen bao gồm trong hệ gen của nó ít nhất một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, và cây ngô chuyển gen có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế tiếp tục đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ trên cánh đồng, bao gồm việc áp dụng thuốc diệt cỏ chứa lượng hiệu quả của glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng mà ít nhất một ngô chuyển gen được trồng trên cánh đồng này, trong đó cây ngô chuyển gen bao gồm trong hệ gen của nó ít nhất một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, và cây ngô chuyển gen có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ kháng glyphosat trên cánh đồng của thực vật chịu glyphosat, bao gồm việc áp dụng thuốc diệt cỏ chứa lượng hiệu quả của glufosinat lên cánh đồng mà ít nhất một ngô chuyển gen chịu được glyphosat được trồng trên cánh đồng này, trong đó ngô chuyển gen chịu được glyphosat bao gồm trong hệ gen của nó ít nhất một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7, và ngô chuyển gen chịu được glyphosat cũng có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm chậm tính kháng ở côn trùng, bao gồm bước trồng ít nhất một ngô chuyển gen có khả năng chịu glyphosat và/hoặc glufosinat trên cánh đồng mà ngô kháng côn trùng được trồng trên đó, trong đó ngô chuyển gen có khả năng chịu glyphosat và/hoặc glufosinat bao gồm trong hệ gen của nó ít nhất một trình tự axit nucleic được lựa chọn từ các trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và

SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế còn đề cập đến sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp bao gồm polynucleotit của SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, trong đó sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp là bột ngô, bột ngô mịn, dầu ngô, tinh bột ngô, gluten ngô, bánh ngô, mỹ phẩm hoặc chất độn.

Trong trình tự axit nucleic để phát hiện ngô chịu thuốc diệt cỏ và phương pháp phát hiện ngô chịu thuốc diệt cỏ theo sáng chế, các định nghĩa và phương pháp dưới đây có thể xác định rõ hơn sáng chế và hướng dẫn cho chuyên gia trong lĩnh vực trong việc thực hành sáng chế. Trừ khi được thông báo rõ theo cách khác, các thuật ngữ được hiểu theo nghĩa sử dụng thông thường bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ cấu trúc của trình tự xen vào gen chuyển và điểm nối hệ gen ngô của trình tự axit nucleic và phương pháp phát hiện trình tự này theo sáng chế, được sử dụng để phát hiện cây ngô DBN9858 chịu được thuốc diệt cỏ.

Fig. 2 là sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10006 của trình tự axit nucleic và phương pháp phát hiện trình tự này theo sáng chế, được sử dụng để phát hiện cây ngô DBN9858 chịu được thuốc diệt cỏ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ “ngô” để chỉ *Zea mays*, và bao gồm tất cả các giống thực vật mà có thể được giao phối với ngô, bao gồm cả các loài ngô hoang dại.

Thuật ngữ “bao gồm” và “bao gồm cả” để chỉ “bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi”.

Thuật ngữ “thực vật” bao gồm thực vật đầy đủ, tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, tế bào trần thực vật, tế bào thực vật và các nuôi cấy mô mà thực vật có thể được sinh ra từ mô này, thể sần thực vật, khóm thực vật và các tế bào thực vật nguyên vẹn trong thực vật hoặc các bộ phận của thực vật như phôi, hạt phấn, noãn, hạt, lá, hoa, cành, quả, cuống, rễ, đầu rễ, bao phấn và bộ phận tương tự. Cần hiểu rằng, bộ phận của thực vật chuyển gen trong phạm vi bảo hộ của sáng chế bao gồm nhưng không bị giới hạn ở tế bào thực vật, tế bào trần, mô, thể sần, phôi, cũng như hoa, cuống, quả, lá và rễ, và các bộ phận của thực vật

như đã nêu ở trên thu được từ thực vật chuyển gen hoặc thể hệ con của nó mà đã được biến nạp bằng phân tử ADN theo sáng chế trước đó và do đó ít nhất một phân bào gồm các tế bào chuyển gen.

Thuật ngữ “gen” để chỉ đoạn axit nucleic mà nó biểu hiện protein đặc hiệu, bao gồm trình tự điều hòa nằm ở trước (các trình tự không mã hóa đầu 5’) và nằm tiếp sau (các trình tự không mã hóa đầu 3’) trình tự mã hóa. “Gen tự nhiên” để chỉ gen khi được phát hiện trong tự nhiên với các trình tự điều hòa của riêng nó. “Gen khảm” để chỉ gen bất kỳ mà không phải là gen tự nhiên, bao gồm các trình tự điều hòa và mã hóa mà không được phát hiện cùng nhau trong tự nhiên. “Gen nội sinh” để chỉ gen tự nhiên ở vị trí tự nhiên của nó trong hệ gen của sinh vật. “Gen ngoại sinh” để chỉ gen hiện tại được phát hiện, nhưng ban đầu không được phát hiện trong hệ gen của sinh vật, và cũng để chỉ gen mà được đưa vào trong tế bào tiếp nhận thông qua các bước chuyển gen. Gen ngoại sinh có thể bao gồm gen tự nhiên hoặc gen khảm mà nó được xen vào trong sinh vật không tự nhiên. “Gen chuyển” là gen mà đã được đưa vào trong hệ gen bằng phương thức biến nạp. Vị trí trong hệ gen thực vật, nơi mà ADN tái tổ hợp đã được xen vào có thể được gọi là “vị trí xen vào” hoặc “vị trí đích”.

“ADN chặn” có thể bao gồm hệ gen được phát hiện tự nhiên trong sinh vật như thực vật hoặc một ADN ngoại sinh (dị tương đồng) được đưa vào bằng phương thức biến nạp, như đoạn kết hợp với sự kiện biến nạp. Do đó, ADN chặn có thể bao gồm tổ hợp của ADN tự nhiên và ADN ngoại sinh. Theo sáng chế, “vùng chặn” hoặc “trình tự chặn” hoặc “vùng biên hệ gen” hoặc “trình tự biên hệ gen” để chỉ trình tự gồm ít nhất 3, 5, 10, 11, 15, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500 hoặc 5000 cặp bazơ hoặc nhiều hơn, vùng này nằm ở ngay phía trên hoặc phía dưới của phân tử ADN ngoại sinh được xen vào ban đầu và cận kề với phân tử ADN ngoại sinh được xen vào ban đầu. Khi được nằm ở xuôi dòng, vùng chặn cũng có thể được gọi là “chặn bờ trái” hoặc “chặn đầu 3’” hoặc “vùng biên hệ gen đầu 3’” hoặc “trình tự biên đầu 3’”, và tương tự. Khi được nằm ở thượng dòng, vùng chặn cũng có thể được gọi là “chặn bờ phải” hoặc “chặn đầu 5’” hoặc “vùng biên hệ gen đầu 5’” hoặc “trình tự biên đầu 5’ hệ gen”, và tương tự.

Phương thức biến nạp dẫn đến sự tích hợp ngẫu nhiên của ADN ngoại

sinh sẽ sinh ra các thể biến nạp bao gồm các vùng chặn khác nhau đặc trưng của và duy nhất đối với mỗi một thể biến nạp. Khi ADN tái tổ hợp được đưa vào trong thực vật thông qua phương pháp lai chéo truyền thống, các vùng chặn của nó thường sẽ không bị thay đổi. Các thể biến nạp cũng sẽ bao gồm các điểm nối đơn giữa đoạn ADN xen dị tương đồng và ADN hệ gen hoặc hai đoạn ADN hệ gen hoặc hai đoạn ADN dị tương đồng. “Điểm nối” là điểm mà ở đó, hai đoạn ADN đặc hiệu kết nối với nhau. Chẳng hạn, điểm nối tồn tại ở nơi mà ADN xen kết nối với ADN chặn. Điểm nối cũng tồn tại trong sinh vật biến nạp ở đó, hai đoạn ADN kết nối với nhau theo phương thức được cải biến từ phương thức được phát hiện ở sinh vật tự nhiên. “ADN kết nối” hoặc “vùng kết nối” để chỉ ADN mà chứa điểm nối.

Sáng chế đề cập đến ngô mang sự kiện chuyển gen được gọi là DBN9858 và thể hệ con của nó, trong đó ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 là ngô DBN9858, bao gồm cả thực vật và hạt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, cũng như tế bào thực vật của nó hoặc các bộ phận mà có thể được tái sinh của nó, bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi các tế bào, hạt phấn, noãn, hoa, nụ, rễ, cuống, tơ, cụm hoa, bông, lá, và các sản phẩm từ ngô DBN9858 như bột ngô, bột ngô mịn, dầu ngô, nước ngô, râu ngô, tinh bột ngô, và sinh khối còn lại trên cánh đồng trồng ngô.

Ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 theo sáng chế bao gồm cấu trúc ADN, và khi cấu trúc được biểu hiện trong tế bào thực vật, ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 tạo ra khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và glufosinat. Cấu trúc ADN chứa hai casset biểu hiện liên tiếp. Casset biểu hiện thứ nhất bao gồm đoạn khởi đầu thích hợp để biểu hiện ở thực vật được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được với gen mà mã hóa cho 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat, và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp. Casset biểu hiện thứ hai bao gồm đoạn khởi đầu thích hợp để biểu hiện ở thực vật được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được với gen mà mã hóa cho phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat, và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp. Ngoài ra, đoạn khởi đầu có thể là đoạn khởi đầu được tách từ thực vật, bao gồm các đoạn khởi đầu cơ định, cảm ứng và/hoặc đặc hiệu mô, đoạn khởi đầu thích

hợp bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi đoạn khởi đầu 35S của virus khảm lá xúp lơ (CaMV), đoạn khởi đầu 35S của virus khảm huyền sâm (FMV), đoạn khởi đầu Tsfl, đoạn khởi đầu ubiquitin, đoạn khởi đầu actin, đoạn khởi đầu nopalin syntaza (NOS) của *Agrobacterium tumefaciens*, đoạn khởi đầu octopin syntaza (OCS), đoạn khởi đầu của virus gây xoắn vàng lá *Cestrum*, đoạn khởi đầu Patatin, đoạn khởi đầu ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza/oxygenaza (RuBisCO), đoạn khởi đầu glutathion S-transferaza (GST), đoạn khởi đầu E9, đoạn khởi đầu GOS, đoạn khởi đầu alcA/alcR, đoạn khởi đầu RolD *Agrobacterium rhizogenes* và đoạn khởi đầu Suc2 *Arabidopsis*. Trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có thể là trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp mà nó hoạt động ở thực vật, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có nguồn gốc từ gen nopalin syntaza (NOS) của *Agrobacterium tumefaciens*, gen kết thúc 35S của virus khảm lá xúp lơ (CaMV), gen kết thúc E9 ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza/oxygenaza ở đậu Hà Lan, gen ức chế proteaza II (PIN II) và gen α -tubulin.

Ngoài ra, cassette biểu hiện có thể bao gồm thêm các yếu tố di truyền khác, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở đoạn tăng cường và peptit tín hiệu/peptit chuyển tiếp. Đoạn tăng cường có thể tăng cường mức biểu hiện của một gen, bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi gen hoạt hóa dịch mã của virus gây bệnh ký axit thuốc lá (TEV), đoạn tăng cường CaMV35S và đoạn tăng cường FMV35S. Peptit tín hiệu/peptit chuyển tiếp có thể dẫn hướng protein EPSPS và/hoặc protein PAT để được vận chuyển ra ngoài tế bào hoặc vào trong các tiểu cơ quan đặc hiệu hoặc các ngăn bên trong tế bào, chẳng hạn, hướng đích vào lục lạp bằng trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp của lục lạp, hoặc hướng đích vào lưới nội chất bằng trình tự giữ 'KDEL'.

Gen 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) có thể được phân lập và thu được từ chủng CP4 *Agrobacterium tumefaciens* sp., và có thể được cải biến cho polynucleotit mã hóa EPSPS bằng cách tối ưu hóa codon hoặc theo các cách khác, để tăng cường độ ổn định và khả năng sẵn sàng của sản phẩm phiên mã trong tế bào biến nạp. Gen 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) có thể được cũng sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc.

“Glyphosat” để chỉ N-phosphonometyl glyxin và muối của nó, và xử lý

bằng “thuốc diệt cỏ glyphosat” để chỉ việc xử lý bằng bất kỳ chế phẩm diệt cỏ nào chứa glyphosat. Việc lựa chọn tỷ lệ sử dụng của thuốc diệt cỏ glyphosat cụ thể để đạt được liều lượng sinh học hiệu quả nằm trong khả năng của người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực nông nghiệp. Việc xử lý cánh đồng bao gồm nguyên liệu thực vật có nguồn gốc từ cây ngô kháng thuốc diệt cỏ DBN9858 với bất kỳ chế phẩm diệt cỏ chứa glyphosat sẽ kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ trên cánh đồng, mà không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng hoặc năng suất của nguyên liệu thực vật thu được từ cây ngô chịu thuốc diệt cỏ DBN9858.

Gen enzym phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) phân lập từ *Streptomyces viridochromogenes* xúc tác cho sự chuyển hóa của L-phosphinothrixin thành dạng bất hoạt của nó nhờ phản ứng axetyl hóa, để truyền cho thực vật khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat. Phosphinothrixin (PTC, axit 2-amino-4-metylphosphonobutyric) là chất ức chế glutamin synthetaza. PTC là đơn vị cấu trúc của kháng sinh 2-amino-4-metylphosphonyl-ananyl-alanin, tripeptit (PTT) này có hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm cũng như kháng nấm *Botrytis cinerea*. Gen phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) có thể được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc.

“Glufosinat”, còn được gọi là “phosphinothrixin”, để chỉ amoni 2-amino-4-[hydroxy(metyl)phosphonyl]butanoat, và việc xử lý bằng “thuốc diệt cỏ glufosinat” để chỉ việc xử lý bằng chế phẩm diệt cỏ bất kỳ chứa glufosinat. Việc lựa chọn tỷ lệ sử dụng của thuốc diệt cỏ glufosinat nào đó để đạt được liều lượng sinh học hiệu quả nằm trong khả năng của người có kỹ năng thông thường trong lĩnh vực nông nghiệp. Việc xử lý cánh đồng bao gồm nguyên liệu thực vật thu được từ cây ngô kháng thuốc diệt cỏ DBN9858 bằng chế phẩm diệt cỏ bất kỳ chứa glufosinat sẽ kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ trên cánh đồng, không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng hoặc năng suất của nguyên liệu thực vật thu được từ ngô chịu thuốc diệt cỏ DBN9858.

Cấu trúc ADN được đưa vào trong thực vật bằng phương pháp biến nạp bao gồm nhưng không bị giới hạn ở phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, phương pháp biến nạp qua trung gian súng bắn gen và phương

pháp biến nạp chuyển qua ống hạt phấn.

Phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* là phương pháp phổ biến để biến nạp thực vật. ADN ngoại sinh được đưa vào thực vật được tách dòng thành vector ở giữa các trình tự thông nhất bờ trái và bờ phải, tức là, các vùng T-ADN. Vector được biến nạp vào trong tế bào *Agrobacterium*, sau đó tế bào này được sử dụng để gây nhiễm mô thực vật, cho phép các vùng T-ADN của vector bao gồm ADN ngoại sinh được xen vào trong hệ gen thực vật.

Phương pháp biến nạp qua trung gian súng bắn gen là việc bắn phá tế bào thực vật bằng vector bao gồm ADN ngoại sinh (phương pháp biến nạp bằng máy bắn gen qua trung gian phần tử).

Phương pháp biến nạp chuyển qua ống hạt phấn là ở chỗ, ADN ngoại sinh được mang thông qua con đường ống hạt phấn tự nhiên (còn được gọi là mô truyền ống hạt phấn) được tạo ra sau khi thụ phấn thực vật, thông qua con đường phôi tâm vào trong mầm phôi.

Sau khi biến nạp, thực vật chuyển gen cần phải được tái sinh từ mô thực vật biến nạp, và được lựa chọn cho thế hệ con có ADN ngoại sinh với chất chỉ thị thích hợp.

Cấu trúc ADN là tổ hợp các phân tử ADN mà chúng được kết nối với nhau, tạo ra một hoặc nhiều cassette biểu hiện. Cấu trúc ADN tốt hơn là plasmid mà nó có khả năng tự sao chép bên trong tế bào vi khuẩn, và bao gồm các vị trí endonucleaza giới hạn khác nhau để đưa vào các phân tử ADN cung cấp các yếu tố gen chức năng, chẳng hạn, đoạn khởi đầu, intron, trình tự dẫn đầu, trình tự mã hóa, vùng gen kết thúc đầu 3' và các trình tự khác. Các cassette biểu hiện chứa trong cấu trúc ADN bao gồm các yếu tố gen cần thiết để cung cấp phiên mã của ARN thông tin, và có thể được thiết kế để biểu hiện trong các tế bào không có nhân điển hình hoặc tế bào nhân chuẩn. Các cassette biểu hiện theo sáng chế được thiết kế để tốt nhất biểu hiện trong các tế bào thực vật.

“Sự kiện” chuyển gen được tạo ra bằng sự biến nạp các tế bào thực vật với cấu trúc ADN dị tương đồng, chẳng hạn, bao gồm cassette biểu hiện axit nucleic chứa gen mong muốn, sự tái sinh của quần thể thực vật xuất phát từ sự gắn bằng phương pháp chuyển gen vào trong hệ gen của thực vật, và lựa chọn thực vật đặc trưng được đặc trưng bằng sự gắn vào vị trí đặc hiệu trong hệ gen.

Thuật ngữ “sự kiện” để chỉ thể biến nạp ban đầu và thể hệ con của thể biến nạp mà chứa ADN dị tương đồng. Thuật ngữ “sự kiện” cũng để chỉ thể hệ con được tạo ra bằng cách lai chéo giới tính giữa thể biến nạp và cá thể từ các giống khác chứa ADN dị tương đồng. Thậm chí sau khi hồi giao lặp lại với thể hệ gốc hồi giao, ADN xen vào và ADN hệ gen chặn từ thể biến nạp gốc cũng tồn tại trong thể hệ con lai chéo ở cùng vị trí trên nhiễm sắc thể. Thuật ngữ “sự kiện” cũng để chỉ trình tự ADN từ thể biến nạp ban đầu chứa ADN xen vào và trình tự hệ gen chặn ngay liền kề với ADN xen vào, trình tự này được kỳ vọng được chuyển sang thể hệ con mà chúng được tạo ra bằng cách lai chéo giới tính một dòng gốc chứa ADN xen vào (chẳng hạn, thể biến nạp ban đầu và thể hệ con thu được từ sự tự giao phối) và dòng gốc không chứa ADN xen vào, và tiếp nhận ADN xen vào chứa gen mong muốn.

Theo sáng chế, thuật ngữ “tái tổ hợp” để chỉ một dạng của ADN và/hoặc protein và/hoặc sinh vật mà thông thường không được phát hiện trong tự nhiên và do đó, được tạo ra bằng sự can thiệp thủ công. Sự can thiệp thủ công này có thể tạo ra phân tử ADN tái tổ hợp và/hoặc thực vật tái tổ hợp. “Phân tử ADN tái tổ hợp” thu được bằng phương pháp tổ hợp nhân tạo của hai đoạn trình tự riêng biệt khác, chẳng hạn, bằng cách tổng hợp hóa học hoặc bằng cách thao tác các đoạn axit nucleic biệt lập bằng kỹ thuật di truyền. Các công nghệ để tiến hành thao tác axit nucleic là đã biết.

Thuật ngữ “chuyển gen” bao gồm bất kỳ tế bào, dòng tế bào, thể sản, mô, bộ phận của thực vật hoặc thực vật, mà kiểu gen của chúng đã được làm thay đổi bằng sự có mặt của axit nucleic dị tương đồng, bao gồm cả các loại chuyển gen ban đầu được làm thay đổi như vậy cũng như các cá thể con cháu được tạo ra bằng lai chéo giới tính hoặc nhân giống vô tính từ các cá thể chuyển gen ban đầu này. Theo sáng chế, thuật ngữ “chuyển gen” không bao gồm những sự thay đổi về hệ gen (nhiễm sắc thể hoặc ngoài nhiễm sắc thể) bằng các phương pháp chọn giống thực vật thông thường hoặc trong các sự kiện xuất hiện tự nhiên như dị giao ngẫu nhiên, nhiễm virus không tái tổ hợp, biến nạp vi khuẩn không tái tổ hợp, sự nhảy gen không tái tổ hợp hoặc đột biến ngẫu phát.

“Dị nguyên” theo sáng chế để chỉ rằng, phân tử thứ nhất thông thường không được phát hiện ở dạng tổ hợp với phân tử thứ hai trong tự nhiên. Chẳng

hạn, phân tử có thể có nguồn gốc từ loài thứ nhất và được xen vào hệ gen của loài thứ hai. Do đó, một phân tử như vậy là khác nguồn với tế bào chủ và được đưa theo cách nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ.

Ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat được trồng theo các bước: trước tiên lai chéo giới tính ngô gốc thứ nhất với ngô gốc thứ hai để tạo ra các thực vật thể hệ con thứ nhất khác nhau, trong đó ngô gốc thứ nhất bao gồm các cây ngô được trồng từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 và thể hệ con của nó thu được bằng cách biến nạp bằng cassette biểu hiện theo sáng chế có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat, và ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat; và tiếp theo, lựa chọn thực vật thể hệ con có khả năng chịu được sự áp dụng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, tiến hành trồng các cây ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat. Các bước này có thể bao gồm thêm bước hồi giao thực vật thể hệ con có khả năng chịu được sự áp dụng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat với ngô gốc thứ hai hoặc cây ngô gốc thứ ba; và tiếp theo, lựa chọn thể hệ con bằng cách áp dụng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat hoặc bằng cách nhận dạng chỉ thị phân tử liên quan tính trạng (như phân tử ADN bao gồm điểm nối được nhận dạng tại đầu 5' và đầu 3' của trình tự xen vào ở ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858), nhờ đó tạo ra cây ngô có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat.

Cũng cần hiểu rằng, hai thực vật chuyển gen khác nhau cũng có thể được lai chéo để tạo ra thể hệ con chứa hai gen ngoại sinh riêng biệt và được bổ sung riêng rẽ. Sự tự phối của thể hệ con thích hợp có thể tạo ra thực vật thể hệ con mà chúng là đồng hợp tử đối với cả hai gen ngoại sinh bổ sung. Sự hồi giao với thực vật gốc và ngoại phối với thực vật không chuyển gen như mô tả ở trên cũng có thể được kỳ vọng, và nhân giống vô tính cũng tiến hành như vậy.

Ngô chuyển gen *Bt* có khả năng tiêu diệt, chẳng hạn, côn trùng/động vật gây hại Lepidoptera và Coleoptera, những vẫn còn lượng nhỏ côn trùng/động vật gây hại sống sót, sau khi nhân giống qua vài thế hệ, chúng có thể có khả năng phát triển thành côn trùng/động vật gây hại kháng lại protein Bt. Để giải

quyết vấn đề côn trùng/động vật gây hại phát triển tính kháng này, cơ quan bảo vệ môi trường Hoa Kỳ (United States Environment Protection Agency) đề xuất hướng dẫn sau liên quan đến việc sử dụng cây trồng chuyển gen: cần phải tạo ra một tỷ lệ nhất định về ngô bẹ (ngô bẹ đòi hỏi dựa vào năng suất, là 5%, 10%, 20% và tương tự và chúng có thể là ngô chuyển gen không kháng côn trùng (như ngô chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ) hoặc ngô kháng động vật gây hại không mong muốn, chúng không nhất thiết là ngô không chuyển gen). Sau khi hầu hết côn trùng/động vật gây hại bị tiêu diệt trên ngô chuyển gen kháng côn trùng tương ứng, một phần côn trùng/động vật gây hại vẫn sống sót trên ngô bẹ, đảm bảo quần thể côn trùng/động vật gây hại không có tính kháng là chiếm ưu thế. Như vậy, thậm chí nếu một lượng nhỏ côn trùng/động vật gây hại có tính kháng được sống sót, thì các gen kháng sẽ bị phai giảm đáng kể sau khi giao phối với côn trùng/động vật gây hại không có tính kháng chiếm ưu thế.

Thuật ngữ “đoạn dò” là phân tử axit nucleic phân lập mà phân tử đánh dấu hoặc phân tử tín hiệu có thể phát hiện được thông thường được gắn với nó, chẳng hạn, chất đồng vị phóng xạ, phôi tử, chất hóa phát quang, hoặc enzym. Đoạn dò như vậy hỗ trợ cho một sợi của axit nucleic mong muốn, trong trường hợp theo sáng chế, cho một sợi của ADN hệ gen từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, dù ADN hệ gen từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc hạt, hoặc từ thực vật hoặc hạt hoặc phần chiết của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Các đoạn dò theo sáng chế bao gồm không chỉ axit deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn bao gồm các polyamit và vật liệu dò khác mà chúng liên kết đặc hiệu với trình tự ADN mong muốn và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của trình tự ADN mong muốn này.

Thuật ngữ “đoạn nối” là đoạn phân tử axit nucleic tách rời mà được ghép vào sợi ADN hỗ trợ mong muốn bằng phép lai axit nucleic để tạo ra thể lai giữa đoạn nối và sợi ADN mong muốn, sau đó được kéo dài dọc theo sợi ADN mong muốn bằng polymeraza, chẳng hạn, ADN polymeraza. Cặp đoạn nối theo sáng chế liên quan đến việc sử dụng chúng để khuếch đại trình tự axit nucleic mong muốn, chẳng hạn, bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) hoặc các phương pháp khuếch đại axit nucleic thông thường khác.

Các đoạn dò và đoạn nối thông thường có độ dài 11 polynucleotit hoặc

nhiều hơn, tốt hơn 18 polynucleotit hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa 24 polynucleotit hoặc nhiều hơn, và tốt nhất 30 polynucleotit hoặc nhiều hơn. Các đoạn dò và đoạn mồi như vậy lai đặc hiệu với trình tự mong muốn trong các điều kiện lai nghiêm ngặt. Tốt hơn là, các đoạn dò và đoạn mồi theo sáng chế có trình tự đầy đủ đồng nhất với axit nucleic liên tiếp của trình tự mong muốn, mặc dù các đoạn dò khác với trình tự ADN mong muốn mà giữ được khả năng lai với trình tự ADN mong muốn có thể được thiết kế bằng các phương pháp thông thường.

Các đoạn mồi và đoạn dò dựa vào ADN hệ gen chặn và các trình tự xen vào theo sáng chế có thể được khẳng định bằng các phương pháp thông thường, chẳng hạn, bằng cách tách các phân tử ADN tương ứng ra khỏi nguyên liệu thực vật có nguồn gốc từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 và xác định trình tự axit nucleic của phân tử ADN này. Phân tử ADN bao gồm trình tự xen chuyển gen và vùng chặn của hệ gen ngô mà một đoạn của nó có thể được sử dụng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò.

Các đoạn dò và đoạn mồi axit nucleic theo sáng chế lai trong các điều kiện nghiêm ngặt với trình tự ADN mong muốn. Phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic thông thường bất kỳ có thể được sử dụng để nhận diện sự có mặt của ADN từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu. Các phân tử axit nucleic hoặc các đoạn của nó có khả năng lai đặc hiệu với các phân tử axit nucleic khác trong những tình huống cụ thể. Như được sử dụng ở đây, hai phân tử axit nucleic được cho là có khả năng lai đặc hiệu với nhau nếu như hai phân tử axit nucleic có khả năng tạo ra cấu trúc axit nucleic sợi kép đối song song. Phân tử axit nucleic được cho là “bổ thể” của phân tử axit nucleic khác nếu như chúng thể hiện sự tương hợp hoàn toàn. Như được sử dụng ở đây, các phân tử được cho là thể hiện “sự tương hợp hoàn toàn” khi mọi nucleotit của một trong các phân tử tương hợp với nucleotit của phân tử khác. Hai phân tử được cho là “tương hợp tối thiểu” nếu như chúng có thể lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng giữ nguyên được gắn với nhau trong ít nhất các điều kiện “nghiêm ngặt thấp” thông thường. Tương tự, các phân tử được cho là “bổ trợ” nếu như chúng có thể lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng giữ nguyên được gắn với nhau trong các điều kiện “nghiêm ngặt cao” thông thường. Các sai lệch từ sự tương hợp hoàn toàn là có thể cho phép, miễn là các sai số này

hoàn toàn không loại trừ khả năng hai phân tử tạo ra cấu trúc sợi kép. Để phân tử axit nucleic sử dụng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò, nó chỉ cần tương hợp đầy đủ về trình tự để có khả năng tạo ra cấu trúc sợi kép ổn định trong điều kiện nồng độ dung môi và muối cụ thể được sử dụng.

Như được sử dụng theo sáng chế, trình tự cơ bản tương đồng là trình tự axit nucleic mà có khả năng lai đặc hiệu với chuỗi bổ trợ của trình tự axit nucleic khác mà được làm thích hợp trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp thúc đẩy sự lai ADN, chẳng hạn, xử lý bằng 6,0 x natri clorua/natri xitrat (SSC) ở nhiệt độ khoảng 45°C, tiếp theo là rửa bằng 2,0 x SSC ở nhiệt độ 50°C, là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chẳng hạn, nồng độ muối ở bước rửa có thể được lựa chọn nằm trong khoảng từ điều kiện nghiêm ngặt thấp khoảng 2,0 x SSC ở nhiệt độ 50°C đến điều kiện nghiêm ngặt cao khoảng 0,2 x SSC ở nhiệt độ 50°C. Ngoài ra, nhiệt độ ở bước rửa có thể được gia tăng từ các điều kiện nghiêm ngặt thấp ở nhiệt độ trong phòng, khoảng 22°C, đến các điều kiện nghiêm ngặt cao ở nhiệt độ khoảng 65°C. Cả nhiệt độ và nồng độ muối đều có thể thay đổi; và nhiệt độ hoặc nồng độ muối có thể được duy trì hằng định trong khi biến còn lại được thay đổi. Tốt hơn, phân tử axit nucleic theo sáng chế sẽ lai đặc hiệu với một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 hoặc các trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ trong số các trình tự nêu trên trong điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, chẳng hạn ở khoảng 2,0 x SSC và khoảng 65°C. Tốt hơn nữa, phân tử axit nucleic theo sáng chế sẽ lai đặc hiệu với một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 hoặc các trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ trong số các trình tự nêu trên trong các điều kiện nghiêm ngặt cao. Theo sáng chế, phân tử axit nucleic chỉ thị ưu tiên có trình tự axit nucleic được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 hoặc các trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ trong số các trình tự nêu trên. Phân tử axit nucleic chỉ thị ưu tiên khác theo sáng chế có chung mức đồng nhất trình tự nằm trong khoảng từ 80% đến 100% hoặc nằm

trong khoảng từ 90% đến 100% với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 hoặc các trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ trong số các trình tự nêu trên. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 có thể được sử dụng làm dấu hiệu chỉ thị trong phương pháp chọn giống thực vật để nhận diện thể hệ con lai chéo di truyền. Sự lai của đoạn dò với phân tử ADN mong muốn có thể được phát hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, các phương pháp này bao gồm nhưng không bị giới hạn ở thể huỳnh quang, thể phóng xạ, thể dựa vào kháng thể và thể huỳnh quang hóa học.

Liên quan đến sự khuếch đại trình tự axit nucleic mong muốn (chẳng hạn, bằng phương pháp PCR) sử dụng các đoạn mồi khuếch đại đặc hiệu, “điều kiện nghiêm ngặt” là điều kiện mà cho phép các đoạn mồi chỉ lai với trình tự axit nucleic mong muốn trong phản ứng khuếch đại nhiệt ADN, trong đó đoạn mồi có trình tự kiểu hoang đại tương ứng (hoặc bổ thể của nó) với trình tự axit nucleic mong muốn có có khả năng liên kết với trình tự axit nucleic mong muốn và tốt hơn tạo ra sản phẩm khuếch đại duy nhất, đó là đơn vị khuếch đại ADN (amplicon - đơn vị siêu sao chép).

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu với (trình tự mong muốn)” chỉ ra rằng, đoạn dò hoặc đoạn mồi trong các điều kiện lai nghiêm ngặt chỉ lai với trình tự mong muốn trong mẫu chứa trình tự mong muốn.

Như được sử dụng theo sáng chế, “ADN khuếch đại” hoặc “amplicon - đơn vị siêu sao chép” để chỉ sản phẩm khuếch đại axit nucleic của phân tử axit nucleic mong muốn mà nó là một phần của khuôn axit nucleic. Chẳng hạn, để xác định xem ngô có xuất phát từ lai chéo giới tính với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 theo sáng chế hay không, hoặc xem mẫu ngô được tập hợp từ canh đồng chứa ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hay không hoặc xem sản phẩm ngô chiết xuất như bột thô, bột hoặc dầu chứa ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, ADN chiết xuất từ mẫu mô hoặc sản phẩm chiết xuất ngô có thể được cho tiến hành phương pháp khuếch đại axit nucleic sử dụng cặp đoạn mồi để tạo ra amplicon (đơn vị siêu sao chép) mà nó là để chẩn đoán về sự có mặt của ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Cặp đoạn mồi

bao gồm đoạn môi thứ nhất xuất phát từ trình tự chặn trong hệ gen của thực vật lên kề với vị trí xen vào của ADN ngoại sinh xen vào, và đoạn môi thứ hai thu được từ ADN ngoại sinh xen vào. Amplicon có độ dài và có trình tự cũng để chẩn đoán đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Amplicon có thể nằm trong khoảng độ dài từ độ dài kết hợp của các cặp đoạn môi cộng thêm một cặp bazơ nucleotit, tốt hơn cộng thêm khoảng 50 cặp bazơ nucleotit, tốt hơn nữa cộng thêm khoảng 250 cặp bazơ nucleotit, và tốt nhất cộng thêm khoảng 450 cặp bazơ nucleotit hoặc nhiều hơn.

Một cách tùy ý, cặp đoạn môi có thể thu được từ các trình tự hệ gen chặn được xen vào hai phía của ADN, để tạo ra amplicon bao gồm toàn bộ trình tự nucleotit xen vào. Một cặp đoạn môi thu được từ trình tự hệ gen thực vật có thể được định vị tại một khoảng cách tính từ trình tự ADN xen vào, khoảng cách này có thể nằm trong khoảng từ một cặp bazơ nucleotit tới khoảng 20.000 cặp bazơ nucleotit. Sử dụng thuật ngữ “amplicon” rõ ràng loại trừ các hiện tượng nhị hợp đoạn môi mà có thể được tạo ra trong phản ứng khuếch đại nhiệt ADN.

Khuếch đại axit polynucleic có thể được hoàn thành bằng phương pháp khuếch đại axit polynucleic bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm cả phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Các phương pháp khuếch đại axit nucleic khác nhau đã được biết rõ đối với các người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp khuếch đại PCR đã được phát triển để khuếch đại lên tới 22 kb của ADN hệ gen và tới 42 kb của ADN thực khuẩn thể. Các phương pháp này cũng như các phương pháp khuếch đại ADN khác trong lĩnh vực có thể được sử dụng trong sáng chế. Trình tự ADN ngoại sinh xen vào và trình tự ADN chặn từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có thể khuếch đại hệ gen của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 sử dụng các trình tự đoạn môi được cung cấp, tiếp theo bằng việc giải trình tự ADN chuẩn của amplicon PCR hoặc của ADN tách dòng.

Bộ kit phát hiện ADN dựa vào các phương pháp khuếch đại ADN bao gồm các đoạn môi ADN mà lai đặc hiệu với ADN mong muốn và khuếch đại amplicon chẩn đoán phát hiện trong các điều kiện phản ứng thích hợp. Bộ kit này có thể cung cấp phương pháp phát hiện dựa vào gel agarosa hoặc nhiều phương pháp để phát hiện amplicon chẩn đoán phát hiện đã biết trong lĩnh vực

kỹ thuật này. Bộ kit bao gồm các đoạn mồi ADN mà tương đồng hoặc bổ trợ cho phần bất kỳ của vùng hệ gen ngô của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, và tương đồng hoặc bổ trợ cho phần bất kỳ của vùng xen của gen chuyển của SEQ ID NO: 5 được tạo ra trong sáng chế. Cụ thể, cặp đoạn mồi được nhận diện là hữu ích trong các phương pháp khuếch đại ADN là SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9, cặp này khuếch đại amplicon chẩn đoán tương đồng với một phần của vùng gen chuyển/hệ gen đầu 5' của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, trong đó amplicon bao gồm SEQ ID NO: 1. Các phân tử ADN khác làm đoạn mồi ADN có thể được lựa chọn từ SEQ ID NO: 5.

Amplicon được tạo ra bởi các phương pháp này có thể được phát hiện bằng nhiều kỹ thuật. Một phương pháp như vậy là Genetic Bit Analysis (phân tích di truyền nhị phân), trong đó oligonucleotit ADN được thiết kế kéo dài qua cả trình tự ADN xen vào và trình tự ADN hệ gen chặn liên kề. Oligonucleotit được làm bất hoạt bên trong các lỗ của đĩa vi chuẩn độ. Sau khi khuếch đại PCR vùng mong muốn (sử dụng một đoạn mồi trong trình tự xen vào và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen chặn liên kề), sản phẩm PCR sợi đơn có thể được lai với oligonucleotit cố định và dùng làm mẫu cho phản ứng mở rộng bazơ đơn sử dụng ADN polymeraza và các ddNTP đánh dấu đặc hiệu của bazơ tiếp theo kỳ vọng. Kết quả có thể đạt được bằng phương pháp dựa vào huỳnh quang hoặc dựa vào ELISA. Tín hiệu chỉ ra sự có mặt của trình tự xen vào/trình tự chặn, do đó chỉ ra sự khuếch đại, phép lai, và sự mở rộng bazơ đơn thành công.

Phương pháp khác là kỹ thuật xác định trình tự nhờ nhiệt, trong đó chuỗi oligonucleotit được thiết kế bắc qua trình tự ADN xen vào và điểm nối ADN hệ gen liên kề. Chuỗi oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng mong muốn (một đoạn mồi trong trình tự xen vào và một đoạn mồi trong trình tự hệ gen chặn) và tiếp theo, được ủ với ADN polymeraza, ATP, sulfurylaza, luciferaza, apyrazaza, adenosin-5'-phosphosulfat và luciferin. Các DNTP được bổ sung riêng biệt và tiếp theo, tín hiệu ánh sáng sinh ra được đo. Tín hiệu ánh sáng biểu thị sự có mặt của trình tự xen vào/trình tự chặn, điều này thể hiện sự khuếch đại, phép lai, và sự mở rộng bazơ đơn hoặc nhiều bazơ thành công.

Hiện tượng phân cực huỳnh quang như được mô tả trong Chen, et al., (Genome Res. 9:492-498, 1999) cũng là phương pháp mà có thể được sử dụng

để phát hiện amplicon theo sáng chế. Bằng cách sử dụng phương pháp này, chuỗi oligonucleotit cần thiết được tạo ra, chuỗi này bắc qua trình tự ADN xen vào và điểm nối ADN hệ gen liền kề. Oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR sợi đơn từ vùng mong muốn (một đoạn môi trong ADN xen vào và một đoạn môi trong trình tự ADN hệ gen chặn) và được ủ với ADN polymeraza và ddNTP đánh dấu huỳnh quang. Sự mở rộng bazơ đơn dẫn đến sự sáp nhập ddNTP mà có thể được xác định về sự thay đổi trong phân cực bằng cách sử dụng huỳnh quang kế. Sự thay đổi trong khi phân cực biểu thị sự có mặt của trình tự xen vào/trình tự chặn chỉ ra sự khuếch đại, phép lai, và sự mở rộng bazơ đơn thành công.

Taqman được mô tả là phương pháp phát hiện và định lượng sự có mặt của trình tự ADN và được giới thiệu đầy đủ trong phần hướng dẫn được cung cấp bởi nhà sản xuất. Tóm lại, đoạn dò oligonucleotit FRET được thiết kế bắc qua trình tự ADN xen vào và điểm nối chặn hệ gen liền kề. Đoạn dò FRET và các đoạn môi PCR (một đoạn môi trong trình tự ADN xen vào và một đoạn môi trong trình tự hệ gen chặn) được cho phản ứng theo cách tuần hoàn với sự có mặt của polymeraza chịu nhiệt và các dNTP. Phép lai của đoạn dò FRET dẫn đến sự tách và giải phóng góc huỳnh quang ra khỏi góc dập tắt trên đoạn dò FRET. Tín hiệu huỳnh quang biểu thị sự có mặt của trình tự xen vào/trình tự chặn, tín hiệu này chỉ ra khuếch đại và phép lai thành công.

Dựa trên nguyên tắc lai, các kỹ thuật thích hợp để phát hiện nguyên liệu thực vật có nguồn gốc từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 chịu thuốc diệt cỏ còn bao gồm thêm phương pháp lai thẩm tách Southern, phương pháp lai thẩm tách Northern và phương pháp lai tại chỗ. Cụ thể, kỹ thuật thích hợp bao gồm: ủ đoạn dò và mẫu, rửa để loại bỏ đoạn dò không gắn kết và phát hiện sự lai của đoạn dò. Phương pháp phát hiện đã mô tả phụ thuộc vào kiểu nhân tố chỉ thị được gắn trên đoạn dò. Chẳng hạn, đoạn dò đánh dấu phóng xạ có thể được phát hiện sử dụng thao tác tiếp xúc và hiện ảnh trên phim X quang hoặc đoạn dò đánh dấu enzym có thể được phát hiện bằng sự thay đổi về màu sắc đạt được khi chuyển hóa cơ chất.

Mốc hiệu phân tử đã được mô tả để sử dụng trong quá trình phát hiện trình tự như được mô tả trong tài liệu Tyangi, et al. (Nature Biotech. 14:303-308,

1996). Một cách vắn tắt, đoạn dò oligonucleotit FRET được thiết kế bắc qua trình tự ADN xen vào và điểm nối chặn hệ gen liền kề. Cấu trúc duy nhất của đoạn dò FRET dẫn đến nó chứa cấu trúc thứ hai mà cấu trúc này có thể duy trì các gốc huỳnh quang và tôi các gốc ở đầu tiêm cận gần. Đoạn dò FRET và các đoạn mồi PCR (một đoạn mồi trong trình tự ADN xen vào và một đoạn mồi ở trình tự hệ gen chặn) được phản ứng theo kiểu tuần hoàn với sự có mặt của polymeraza chịu nhiệt và dNTP. Sau khi khuếch đại PCR thành công, phép lai của đoạn dò FRET với trình tự đích dẫn đến mất cấu trúc thứ hai đoạn dò và tách không gian của các gốc huỳnh quang và tôi, sinh ra tín hiệu huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang biểu thị sự có mặt của trình tự xen vào/trình tự chặn, tín hiệu này chỉ ra sự khuếch đại và phép lai thành công.

Các phương pháp mô tả khác như kênh dẫn vi lưu đề cập đến phương pháp và thiết bị để tách và khuếch đại mẫu ADN. Chất nhuộm quang sắc được sử dụng để phát hiện và thử nghiệm phân tử ADN đặc hiệu. Thiết bị ống nano hữu ích trong quá trình phát hiện phân tử ADN theo sáng chế, thiết bị này bao gồm bộ cảm biến điện tử để phát hiện phân tử ADN hoặc liên kết hạt nano với phân tử ADN đặc hiệu, và do đó có thể được phát hiện.

Bộ kit phát hiện ADN có thể được phát triển sử dụng thành phần được mô tả theo sáng chế và các phương pháp đã mô tả hoặc đã biết trong lĩnh vực phát hiện ADN. Bộ kit này tạo thuận lợi cho việc nhận diện sự có mặt của ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu, và ngoài ra, có thể được sử dụng để gây giống các cây ngô chứa ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Bộ kit có thể chứa các đoạn mồi hoặc đoạn dò ADN mà tương đồng hoặc bổ trợ cho ít nhất một phần của SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 hoặc 5, hoặc các đoạn mồi hoặc đoạn dò ADN khác mà tương đồng hoặc bổ trợ cho ADN chứa trong các yếu tố di truyền gen chuyển của ADN, và các trình tự ADN này có thể được sử dụng trong phản ứng khuếch đại ADN hoặc làm đoạn dò trong phương pháp lai ADN. Cấu trúc ADN của trình tự xen vào gen chuyển và điểm nối hệ gen ngô được chứa trong hệ gen ngô và được minh họa trong hình vẽ trên Fig. 1 và bảng 1 bao gồm: vùng hệ gen chặn của ngô DBN9858 nằm ở đầu tận cùng 5' của trình tự xen vào gen chuyển; phần trình tự xen vào của vùng bờ trái (LB) từ *Agrobacterium*; casset biểu hiện thứ nhất, casset này gồm có đoạn khởi đầu 35S

(pr35S) của virus khảm lá xúp lơ chứa các đoạn lặp liên tiếp của vùng tăng cường được kết nối theo kiểu hoạt động được với phosphinothrixin N-axetyl transferaza (cPAT) chịu glufosinat từ *Streptomyces* và với gen kết thúc 35S (t35S) của virus khảm lá xúp lơ; cassette biểu hiện thứ hai, cassette này gồm có đoạn khởi đầu actin-1 ở lúa (prOsAct1) được kết nối theo kiểu hoạt động được với trình tự mã hóa peptid chuyển tiếp của lục lạp EPSPS *Arabidopsis thaliana* (spAtCTP2), với 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimat syntaza chịu glyphosat (cEPSPS) từ chủng CP4 *Agrobacterium* và với gen kết thúc phiên mã nopalin syntaza (tNos); phần trình tự xen vào của vùng bờ phải (RB) từ *Agrobacterium*; cũng như vùng hệ gen chặn của ngô DBN9858 nằm ở đầu tận cùng 3' của trình tự xen vào gen chuyển (SEQ ID NO:5). Các phân tử ADN hữu ích làm các đoạn mỗi trong phương pháp khuếch đại ADN có thể thu được từ phần bất kỳ của trình tự xen vào gen chuyển ở ngô DBN9858, và cả phần bất kỳ của vùng ADN của hệ gen chặn ngô trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có thể được kết hợp với các giống ngô chuyển gen khác, chẳng hạn, ngô chịu được các thuốc diệt cỏ (như 2,4-D, dicamba và tương tự), hoặc các giống ngô chuyển gen mang các gen kháng côn trùng khác (như *Cry1Ab*, *Vip3A* và tương tự). Việc nhân giống của các tổ hợp khác nhau của tất cả các sự kiện gen chuyển khác nhau này với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 theo sáng chế có thể tạo ra các giống ngô chuyển gen lai cải tiến kháng lại các côn trùng khác nhau và chịu được các thuốc diệt cỏ khác nhau, các giống này thể hiện các đặc tính tuyệt vời hơn như năng suất cao và tương tự, khi được so sánh với các giống không chuyển gen và các giống chuyển gen với tính trạng đơn duy nhất.

Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic hữu ích để phát hiện ngô chịu được thuốc diệt cỏ DBN9858 và phương pháp phát hiện trình tự nêu trên, ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 chịu được tác dụng gây độc cho thực vật của các thuốc diệt cỏ dùng trong nông nghiệp chứa glyphosat và/hoặc glufosinat. Ngô có các tính trạng kép này biểu hiện các protein 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) kháng glyphosat từ chủng CP4 *Agrobacterium*, mà truyền tính chịu glyphosat cho thực vật; và các protein phosphinothrixin N-axetyl transferaza (PAT) kháng glufosinat từ *Streptomyces*,

mà truyền tính chịu glufosinat cho thực vật. Ngô với các tính trạng kép này có các lợi thế sau: 1) khả năng áp dụng các thuốc diệt cỏ dùng trong nông nghiệp chứa glyphosat lên cây trồng ngô để kiểm soát cỏ phổ rộng; 2) tính trạng chịu được glufosinat có thể hoạt động như là phương tiện không chọn lọc hiệu quả để kiểm soát cỏ kháng glyphosat khi được sử dụng kết hợp với thuốc diệt cỏ glufosinat (trong hỗn hợp với thuốc diệt cỏ glyphosat hoặc theo cách khác); 3) ngô chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ là ngô chuyển gen không kháng côn trùng có thể làm chậm sự phát triển tính kháng bởi côn trùng/vật gây hại khi được trồng cùng với ngô chuyển gen có tính kháng côn trùng theo tỷ lệ riêng; 4) không làm giảm năng suất của ngô. Ngoài ra, gen mã hóa các tính trạng chịu glyphosat và chịu glufosinat được liên kết trên cùng đoạn ADN, và có mặt trong locut (ổ gen) đơn của hệ gen ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Điều này tạo ra hiệu quả chọn giống cao và cho phép theo dõi đoạn xen vào của gen chuyển được chứa trong quần thể sinh sản và thế hệ con của chúng sử dụng chỉ thị phân tử. Trong khi đó, SEQ ID NO: 1, 2, 6 hoặc 7, hoặc các trình tự bổ sung của chúng trong phương pháp phát hiện theo sáng chế có thể được sử dụng làm các đoạn mồi hoặc đoạn dò ADN để sinh ra các sản phẩm khuếch đại được chẩn đoán là ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thế hệ con cháu của nó và nhận diện một cách nhanh chóng, chính xác và ổn định sự có mặt của nguyên liệu thực vật có nguồn gốc từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1: 11 nucleotit ở mỗi bên của vị trí xen vào của đoạn gen chuyển đầu 5' và ADN hệ gen ngô trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858;

SEQ ID NO: 2: 11 nucleotit ở mỗi bên của vị trí xen vào của đoạn gen chuyển đầu 3' và ADN hệ gen ngô trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858;

SEQ ID NO: 3: trình tự có độ dài 1301 nucleotit nằm liền kề với điểm nối xen vào tại đầu tận cùng 5' của trình tự xen vào trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858;

SEQ ID NO: 4: trình tự có độ dài 1310 nucleotit nằm liền kề với điểm nối xen vào tại đầu tận cùng 3' của trình tự xen vào trong ngô

mang sự kiện chuyển gen DBN9858;

SEQ ID NO: 5: trình tự T-ADN toàn phần, trình tự hệ gen ngô chặn đầu 5' và 3';

SEQ ID NO: 6: trình tự nằm bên trong SEQ ID NO: 3 mà bắc qua trình tự ADN của cấu trúc DBN10006 và trình tự gen khởi điểm pr35S;

SEQ ID NO: 7: trình tự nằm bên trong SEQ ID NO: 4 mà nó bắc qua trình tự gen kết thúc tNos và trình tự ADN của cấu trúc DBN10006;

SEQ ID NO: 8: đoạn môi thứ nhất để khuếch đại SEQ ID NO: 3;

SEQ ID NO: 9: đoạn môi thứ hai để khuếch đại SEQ ID NO: 3;

SEQ ID NO: 10: đoạn môi thứ nhất để khuếch đại SEQ ID NO: 4;

SEQ ID NO: 11: đoạn môi thứ hai để khuếch đại SEQ ID NO: 4;

SEQ ID NO: 12: đoạn môi trên trình tự hệ gen chặn đầu 5';

SEQ ID NO: 13: đoạn môi nằm trên T-ADN ghép cặp với SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 14: đoạn môi trên trình tự hệ gen chặn đầu 3' mà đoạn môi này được ghép cặp với SEQ ID NO: 12 để xác định xem gen chuyển là đồng hợp tử hay dị hợp tử;

SEQ ID NO: 15: đoạn môi nằm trên T-ADN ghép cặp với SEQ ID NO: 14;

SEQ ID NO: 16: đoạn môi 1 để phát hiện *EPSPS* bằng Taqman;

SEQ ID NO: 17: đoạn môi 2 để phát hiện *EPSPS* bằng Taqman;

SEQ ID NO: 18: đoạn dò 1 để phát hiện *EPSPS* bằng Taqman;

SEQ ID NO: 19: đoạn môi 3 để phát hiện *PAT* bằng Taqman;

SEQ ID NO: 20: đoạn môi 4 để phát hiện *PAT* bằng Taqman;

SEQ ID NO: 21: đoạn dò 2 để phát hiện *PAT* bằng Taqman;

SEQ ID NO: 22: đoạn môi thứ nhất của gen nội sinh ở ngô *Ubiquitin*;

SEQ ID NO: 23: đoạn môi thứ hai của gen nội sinh ở ngô *Ubiquitin*;

SEQ ID NO: 24: đoạn dò của *PAT* trong phát hiện lai thẩm tách Southern;

SEQ ID NO: 25: đoạn dò của *EPSPS* trong phát hiện lai thẩm tách Southern;

SEQ ID NO: 26: đoạn môi nằm trên T-ADN mà cùng chiều với SEQ ID NO:

13;

SEQ ID NO: 27: đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà ngược chiều với SEQ ID NO: 13 và được sử dụng để thu được trình tự chặn;

SEQ ID NO: 28: đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà ngược chiều với SEQ ID NO: 13 và được sử dụng để thu được trình tự chặn;

SEQ ID NO: 29: đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà cùng chiều với SEQ ID NO: 15;

SEQ ID NO: 30: đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà ngược chiều với SEQ ID NO: 15 và được sử dụng để thu được trình tự chặn;

SEQ ID NO: 31: đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó ngược chiều với SEQ ID NO: 15 và được sử dụng để thu được trình tự chặn.

Sau đây, các giải pháp kỹ thuật theo sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự tham chiếu các hình vẽ và ví dụ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, các giải pháp kỹ thuật của trình tự axit nucleic và phương pháp phát hiện trình tự này theo sáng chế được sử dụng để phát hiện ngô chịu được thuốc diệt cỏ DBN9858, sẽ được minh họa thêm thông qua các ví dụ cụ thể.

Ví dụ 1. Tách dòng và biến nạp

1.1. Tách dòng vector

Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10006 được tạo ra sử dụng kỹ thuật tách dòng gen chuẩn (như được thể hiện ở hình vẽ trên Fig. 2). Vector DBN10006 chứa hai casset biểu hiện gen chuyển liên tiếp. Casset biểu hiện thứ nhất gồm có đoạn khởi đầu 35S (pr35S) của virus khảm lá xúp lơ chứa các đoạn lặp liên tiếp của vùng tăng cường mà nó được kết nối theo kiểu hoạt động được với phosphinothrixin N-axetyl transferaza (cPAT) chịu glufosinat từ *Streptomyces* và với gen kết thúc 35S (t35S) của virus khảm lá xúp lơ. Casset biểu hiện thứ hai gồm có đoạn khởi đầu actin-1 (prOsAct1) của lúa mà nó được kết nối linh hoạt với trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp lục lạp EPSPS (spAtCTP2) *Arabidopsis thaliana*, với 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza chịu được glyphosat từ chủng *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (cEPSPS) và với gen kết thúc phiên mã nopalín syntaza (tNos).

Vecto DBN10006 được biến nạp vào trong *Agrobacterium* LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA; Cat.No: 18313-015) sử dụng phương pháp nitơ lỏng, và các tế bào biến nạp được sàng lọc bằng 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS) làm chỉ thị chọn lọc.

1.2. Biến nạp thực vật

Sự biến nạp được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp gây nhiễm *Agrobacterium* thông thường. Phôi ấu thể ngô được cấy vô trùng đồng thời với *Agrobacterium* được mô tả trong phần 1.1 của ví dụ này, để chuyển T-ADN trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN10006 đã tạo ra vào trong hệ gen ngô, bằng cách đó tạo ra ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Đối với phương pháp biến nạp ngô qua trung gian *Agrobacterium* thông thường: một cách vắn tắt, phôi ấu thể chưa trưởng thành được phân lập từ ngô và được cho tiếp xúc với huyền phù *Agrobacterium*, trong đó trình tự nucleotit của các gen *EPSPS* và *PAT* có thể được chuyển sang ít nhất một tế bào của một trong số các phôi ấu thể bằng *Agrobacterium* (bước 1: bước gây nhiễm). Trong bước này, phôi ấu thể tốt hơn được nhúng vào trong huyền phù *Agrobacterium* ($OD_{660}=0,4-0,6$, môi trường gây nhiễm (muối MS 4,3 g/L, vitamin MS, casein 300 mg/L, sucroza 68,5 g/L, glucoza 36 g/L, axetosyringon (AS) 40 mg/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/L, pH 5,3) để bắt đầu cấy. Phôi ấu thể được cấy đồng thời cùng với *Agrobacterium* trong một khoảng thời gian (3 ngày) (bước 2: bước cấy đồng thời). Tốt hơn là, phôi ấu thể được cấy trên môi trường rắn (muối MS 4,3 g/L, vitamin MS, casein 300 mg/L, sucroza 20 g/L, glucoza 10 g/L, axetosyringon (AS) 100 mg/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/L, thạch aga 8 g/L, pH 5,8) tiếp sau bước gây nhiễm. Sau giai đoạn cấy đồng thời này, bước “thu hồi” tùy ý được dự định. Trong bước “thu hồi”, có ít nhất một kháng sinh đã biết để ức chế sự sinh trưởng của *Agrobacterium* (cephalosporin) trong môi trường thu hồi (muối MS 4,3 g/L, vitamin MS, casein 300 mg/L, sucroza 30 g/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/L, phytigel 3 g/L, pH 5,8), và không có tác nhân chọn lọc nào của các thể biến nạp thực vật được bổ sung (bước 3: bước thu hồi). Tốt hơn, phôi ấu thể được cấy trên môi trường rắn có kháng sinh nhưng không có tác nhân chọn lọc nào để loại trừ *Agrobacterium* và cung cấp một giai đoạn thu hồi cho các tế bào bị nhiễm. Tiếp

theo, phôi ấu thể đã chủng được cấy lên môi trường chứa tác nhân chọn lọc (glyphosat) và được chọn lọc để sinh trưởng thể sản biến nạp (bước 4: bước chọn lọc). Tốt hơn, phôi ấu thể được cấy lên môi trường rắn chọn lọc có tác nhân chọn lọc (muối MS 4,3 g/L, vitamin MS, casein 300 mg/L, sucroza 30 g/L, N-(phosphonometyl)glyxin 0,25 mol/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1 mg/L, phytigel 3 g/L, pH 5,8), dẫn tới sự sinh trưởng chọn lọc của các tế bào biến nạp. Sau đó, thể sản được tái sinh thành thực vật (bước 5: bước tái sinh). Tốt hơn, thể sản sinh trưởng trên môi trường chứa tác nhân chọn lọc được cấy lên môi trường rắn (môi trường biệt hóa MS và môi trường tạo rễ MS) để tái sinh thực vật.

Thể sản kháng chọn lọc được chuyển lên trên môi trường biệt hóa MS (muối MS 4,3 g/L, vitamin MS, casein 300 mg/L, sucroza 30 g/L, 6-benzyladenin 2 mg/L, N-(phosphonometyl)glyxin 0,125 mol/L, phytigel 3 g/L, pH 5,8), và được cấy ở nhiệt độ 25°C để biệt hóa. Cây non biệt hóa được chuyển lên môi trường tạo rễ MS (muối MS 2,15 g/L, vitamin MS, casein 300 mg/L, sucroza 30 g/L, axit indol-3-axetic 1 mg/L, thạch aga 8 g/L, pH 5,8), được trồng ở nhiệt độ 25°C tới độ cao khoảng 10 cm, và tiếp theo, được chuyển sang nhà kính và được trồng cho tới khi chắc khỏe. Trong nhà kính, việc trồng được thực hiện ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 16 giờ mỗi ngày, sau đó ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 8 giờ.

1.3. Nhận diện và sàng lọc các sự kiện chuyển gen

Tổng cộng 332 thực vật chuyển gen riêng biệt T₀ được tạo ra.

Sự có mặt của các gen *EPSPS* và *PAT* trong các cây ngô chuyển gen tái sinh được phát hiện bằng phương pháp phân tích TaqmanTM (xem trong ví dụ 2), và số lượng dòng sao chép chịu được glyphosat và glufosinat được mô tả. Bằng cách sàng lọc, có thể lựa chọn sự kiện DBN9858 tuyệt vời, sự kiện này có các đặc tính về các gen sao chép đơn, khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat, khả năng chịu thuốc diệt cỏ glufosinat và các tính trạng nông học thích hợp (xem trong ví dụ 5).

Ví dụ 2. Phát hiện ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 sử dụng TaqMan

Khoảng 100 mg lá được lấy từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 làm mẫu, ADN hệ gen được chiết tách bằng cách sử dụng bộ DNeasy Plant

Maxi Kit từ Qiagen, và số bản sao của các gen *EPSPS* và *PAT* được phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang bằng đoạn dò Taqman. Trong khi đó, cây ngô kiểu dại được sử dụng làm đối chứng, và được phát hiện và phân tích như mô tả ở trên. Thử nghiệm được thực hiện trong ba lần và lấy giá trị trung bình.

Phương pháp cụ thể như sau:

Bước 11. Khoảng 100 mg lá được lấy từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và được đồng nhất hóa trong cối giã sử dụng nitơ lỏng. Mỗi một mẫu được lấy ba lần;

Bước 12. ADN hệ gen của các mẫu nêu trên được chiết sử dụng bộ kit có tên DNeasy Plant Maxi Kit từ Qiagen. Đối với phương pháp cụ thể, xin xem trong các hướng dẫn của sản phẩm;

Bước 13. Nồng độ của ADN hệ gen của các mẫu nêu trên được phát hiện bằng cách sử dụng NanoDrop 2000 (Thermo Scientific);

Bước 14. Nồng độ của ADN hệ gen của các mẫu nêu trên được điều chỉnh tới giá trị nồng độ như nhau nằm trong khoảng từ 80 đến 100 ng/μl;

Bước 15. Số bản sao chép của các mẫu nêu trên được nhận diện sử dụng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang bằng đoạn dò Taqman, mẫu được nhận diện là có số bản sao đã biết được sử dụng làm chuẩn, và ngô kiểu hoang dại được sử dụng làm đối chứng. Mỗi một mẫu thực hiện ba lần và lấy giá trị trung bình. Các đoạn mồi và đoạn dò của phương pháp PCR định lượng huỳnh quang lần lượt là:

Các đoạn mồi và đoạn dò sau được sử dụng để phát hiện trình tự gen *EPSPS*:

Đoạn mồi 1: CTGGAAGGCGAGGACGTCATCAATA, như được nêu trong SEQ ID NO: 16 của danh mục trình tự;

Đoạn mồi 2: TGGCGGCATTGCCGAAATCGAG, như được nêu trong SEQ ID NO: 17 của danh mục trình tự

Đoạn dò 1: ATGCAGGCGATGGGCGCCCGCATCCGTA, như được nêu trong SEQ ID NO: 18 của danh mục trình tự;

Các đoạn mồi và đoạn dò sau được sử dụng để phát hiện trình tự gen *PAT*:

Đoạn môi 3: CAGTTGAGATTAGGCCAGCTACAG, như được nêu trong SEQ ID NO: 19 của danh mục trình tự;

Đoạn môi 4: TTCACTGTAGACGTCTCAATGTAATGG, như được nêu trong SEQ ID NO: 20 của danh mục trình tự;

Đoạn dò 2: CAGCTGATATGGCCGCGGTTTGTG, như được nêu trong SEQ ID NO: 21 của danh mục trình tự;

Hệ phản ứng PCR:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 µL
50 x đoạn môi/đoạn dò mix	1 µL
ADN hệ gen	3 µL
Nước (dd H ₂ O)	6 µL

Hỗn hợp 50 x đoạn môi/đoạn dò chứa 45 µL của mỗi một đoạn môi tại nồng độ 1 mM, 50 µL của 100 µM đoạn dò và 860 µL của 1 x dung dịch đệm TE, và được bảo quản trong ống hồ phách ở nhiệt độ 4°C.

Các điều kiện phản ứng PCR:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
21	95°C	5 phút
22	95°C	30 giây
23	60°C	1 phút
24	Trở lại bước 22, và lặp lại trong 40 lần	

Dữ liệu được phân tích sử dụng phần mềm SDS2.3 (Applied Biosystems) và bản sao đơn của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 thu được.

Ví dụ 3. Phát hiện ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858

3.1. Chiết ADN hệ gen

ADN được chiết theo phương pháp CTAB thường được sử dụng (hexadexyl trimetyl amoni bromua): 2 g lá non được lấy từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 và được nghiền thành bột trong ni tơ lỏng. Sau đó, 0,5 mL dung dịch đệm CTAB để chiết ADN được gia nhiệt sơ bộ ở nhiệt độ 65°C (CTAB 20 g/L, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM (etylen diamin

của axit tetraaxetic), được điều chỉnh tới độ pH 8,0 bằng NaOH) được bổ sung, kết hợp đầy đủ và tiếp theo, được chiết ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 90 phút. 0,5 thể tích của phenol và 0,5 thể tích của clorofom được bổ sung, được trộn kết hợp bằng cách đảo ngược và được ly tâm với tốc độ quay 12000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Lớp nổi trên bề mặt được hút ra và 2 thể tích etanol tuyệt đối được bổ sung vào đó. Ống ly tâm được lắc nhẹ và để yên ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 30 phút. Thao tác ly tâm được thực hiện với tốc độ quay 12000 vòng/phút trong thời gian 10 phút nữa và ADN được tập hợp ở đáy ống. Lớp nổi lên trên bề mặt được loại bỏ, và viên kết được rửa bằng 1 ml etanol với việc cô đặc khối lượng còn 70%, được ly tâm với tốc độ quay 12000 vòng/phút trong thời gian 5 phút và được hút khô trong chân không hoặc được thổi khô trên bàn siêu sạch. Viên ADN được hòa tan trong một lượng thích hợp dung dịch đệm TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0), và được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 20°C.

3.2. Phân tích trình tự ADN chặn

Nồng độ các mẫu ADN chiết ở trên được thử nghiệm phân tích và nồng độ của các mẫu cần thử nghiệm được hiệu chỉnh nằm trong khoảng từ 80 đến 100 ng/μL. ADN hệ gen được tách lần lượt sử dụng các endonucleaza giới hạn chọn lọc *Bam*H I, *Xma* I, *Kpn* I, *Sac* II (để phân tích đầu tận cùng 5') và *Spe* I, *Pst* I, *Eco*57 I (để phân tích đầu tận cùng 3'). Trong mỗi một hệ phân cắt enzym, 26,5 μL ADN hệ gen, 0,5 μL endonucleaza giới hạn chọn lọc ở trên và 3 μL dung dịch đệm phân cắt được bổ sung vào đó. Sự phân cắt enzym được thực hiện trong thời gian 1 giờ. Sau khi hoàn thành sự phân cắt, 70 μL etanol tuyệt đối được bổ sung vào hệ phân cắt enzym, để trong bể nước đá trong thời gian 30 phút và được ly tâm với tốc độ quay 12000 vòng/phút trong thời gian 7 phút. Lớp nổi trên bề mặt được loại bỏ, và thổi khô. Sau đó, 8,5 μL nước cất hai lần (dd H₂O), 1 μL dung dịch đệm 10X T₄ và 0,5 μL T₄-ligaza được bổ sung và được thất ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Kỹ thuật PCR khuếch đại được thực hiện sử dụng một loạt các đoạn mồi xếp để tách ADN chuyển gen/hệ gen đầu 5' và 3'. Cụ thể, tổ hợp đoạn mồi ADN để tách ADN chuyển gen/hệ gen đầu 5' bao gồm SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 26 làm đoạn mồi thứ nhất, SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28 làm đoạn mồi thứ hai, và SEQ ID NO: 13 làm đoạn mồi giải

trình tự. Tổ hợp đoạn mỗi ADN để tách ADN chuyển gen/hệ gen đầu 3' bao gồm SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 29 làm đoạn mỗi thứ nhất, SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31 làm đoạn mỗi thứ hai, và SEQ ID NO: 15 làm đoạn mỗi xác định trình tự. Các điều kiện phản ứng PCR như được thể hiện trong bảng 3.

Amplicon thu được được điện di trên gel agarosa 2,0% để phân lập sản phẩm PCR, và tiếp theo, các đoạn mong muốn được phân lập từ khuôn agarosa sử dụng bộ kit chiết QIAquick Gel (Cat#_ 28704, Qiagen Inc., Valencia, CA). Sau đó, sản phẩm PCR tinh chế được giải trình tự (chẳng hạn, ABI Prism™ 377, PE Biosystems, Foster City, CA) và được phân tích (chẳng hạn, phần mềm phân tích trình tự DNASTAR, DNASTAR Inc., Madison, WI).

Trình tự chặn đầu 5' và 3' và trình tự nối được xác định sử dụng phương pháp PCR chuẩn. Trình tự chặn đầu 5' và trình tự nối có thể được xác định sử dụng SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 12 trong tổ hợp với SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 26. Trình tự chặn đầu 3' và trình tự nối có thể được xác định sử dụng SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 14 trong tổ hợp với SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15 hoặc SEQ ID NO: 29. Hệ phản ứng PCR và các điều kiện khuếch đại như được thể hiện trong các bảng 2 và 3. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, các đoạn mỗi khác cũng có thể được sử dụng để xác định trình tự chặn và trình tự nối.

Sự xác định trình tự ADN cho sản phẩm PCR tạo ra ADN hữu ích cho việc thiết kế các phân tử ADN khác mà được sử dụng làm các đoạn mỗi và đoạn dò để nhận diện cây ngô hoặc hạt dẫn có nguồn gốc từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Đã phát hiện ra rằng trình tự hệ gen ngô thể hiện tại các nucleotit 1-1067 của SEQ ID NO: 5 chặn bờ phải của trình tự xen vào của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 (trình tự chặn đầu 5'), và trình tự hệ gen ngô thể hiện tại các nucleotit 5829-6890 của SEQ ID NO: 5 chặn bờ trái của trình tự xen vào của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 (trình tự chặn đầu 3'). Trình tự nối đầu 5' được nêu trong SEQ ID NO: 1, và trình tự nối đầu 3' được nêu trong SEQ ID NO: 2.

3.3. Thử nghiệm tiếp hợp giao tử PCR

Các trình tự nối là các phân tử polynucleotit tương đối ngắn mà chúng là

các trình tự ADN mới, và để chẩn đoán phát hiện ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 khi được phát hiện trong phân tích phát hiện đa axit nucleic. Các trình tự nối trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 là vị trí xen vào của đoạn chuyển gen ở ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 và 11 polynucleotit ở mỗi phía của ADN hệ gen ngô. Các trình tự nối polynucleotit dài hơn hoặc ngắn hơn có thể được lựa chọn từ SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4. Các trình tự nối (vùng nối đầu 5' của SEQ ID NO: 1, và vùng nối đầu 3' của SEQ ID NO: 2) là hữu ích làm các phân tử đoạn dò ADN hoặc đoạn mồi ADN trong các phương pháp phát hiện ADN. Các trình tự nối SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 cũng là các trình tự ADN mới trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, chúng cũng có thể được sử dụng làm các phân tử đoạn dò ADN hoặc đoạn mồi ADN để phát hiện sự có mặt của ADN ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. SEQ ID NO: 6 (nucleotit 1068 đến nucleotit 1301 của SEQ ID NO: 3) bắc qua trình tự ADN của cấu trúc DBN10006 và trình tự gen khởi điểm pr35S, và SEQ ID NO: 7 (nucleotit 1 đến nucleotit 248 của SEQ ID NO: 4) bắc qua trình tự gen kết thúc tNos và trình tự ADN của cấu trúc DBN10006.

Ngoài ra, amplicon được tạo ra bằng cách sử dụng ít nhất một đoạn mồi từ SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4, và đoạn mồi tạo ra amplicon chẩn đoán phát hiện của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 khi được sử dụng trong phương pháp PCR.

Cụ thể, sản phẩm PCR được tạo ra từ đầu 5' của trình tự xen vào gen chuyển, và sản phẩm PCR là một phần của ADN hệ gen chặn đầu 5' của trình tự xen vào T-ADN mà xuất phát từ hệ gen của nguyên liệu thực vật của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Sản phẩm PCR này bao gồm SEQ ID NO: 3. Để khuếch đại PCR, đoạn mồi 5 (SEQ ID NO: 8) lai với trình tự ADN hệ gen chặn đầu 5' của trình tự xen vào gen chuyển, và đoạn mồi tạo cặp 6 (SEQ ID NO: 9) nằm tại trình tự kết thúc phiên mã tNos chuyển gen được thiết kế.

Sản phẩm PCR được tạo ra từ đầu 3' của trình tự xen vào gen chuyển, và sản phẩm PCR bao gồm một phần của ADN hệ gen chặn đầu 3' của trình tự xen vào T-ADN mà được xuất phát từ hệ gen của nguyên liệu thực vật của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Sản phẩm PCR này bao gồm SEQ ID NO: 4. Để khuếch đại PCR, đoạn mồi 8 (SEQ ID NO: 11) mà lai với trình tự ADN hệ gen

chặn đầu 3' của trình tự xen vào gen chuyển, và đoạn môi tạo cặp 7 (SEQ ID NO: 10) của trình tự gen khởi điểm pr35S nằm tại đầu 3' của đoạn xen vào được thiết kế.

Các điều kiện khuếch đại ADN được minh họa trong bảng 2 và bảng 3 có thể được sử dụng trong thử nghiệm thử nghiệm tiếp hợp giao tử PCR ở trên để tạo ra amplicon chẩn đoán phát hiện của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Việc phát hiện các amplicon có thể được thực hiện sử dụng thiết bị Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700, hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient như được thể hiện trong bảng 3, hoặc bằng các phương pháp và thiết bị đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bảng 2. Các bước PCR và các điều kiện hỗn hợp phản ứng để nhận diện đoạn xen vào gen chuyển đầu 5'/vùng nối hệ gen của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Bước	Tác nhân phản ứng	Lượng	Chú thích
1	Nước không chứa nucleaza	bổ sung tới thể tích cuối cùng 20 μ L	
2	10 X dung dịch đệm phản ứng (với $MgCl_2$)	2,0 μ L	1 X nồng độ cuối cùng của dung dịch đệm, nồng độ cuối cùng 1,5 mM của $MgCl_2$
3	10 mM dung dịch của dATP, dCTP, dGTP và dTTP	0,4 μ L	nồng độ cuối cùng 200 μ M của mỗi một dNTP
4	Đoạn môi sự kiện 5 (SEQ ID NO:8 được tái tạo huyền phù trong 1 X dung dịch đệm TE hoặc nước không chứa nucleaza tới nồng độ 10 μ M)	0,2 μ L	nồng độ cuối cùng 0,1 μ M
5	Đoạn môi sự kiện 6 (SEQ	0,2 μ L	nồng độ cuối

	ID NO:9 được tái tạo huyền phù trong 1 X dung dịch đệm TE hoặc nước không chứa nucleaza tới nồng độ 10 μ M)		cùng 0,1 μ M
6	Không chứa RNaza, DNaza (500 μ g/ml)	0,1 μ L	50 ng/phản ứng
7	<i>REDTaq</i> ADN polymeraza (1 đơn vị/ μ l)	1,0 μ l (được khuyến cáo chuyển các ống hút trước khi sang bước tiếp theo)	1 đơn vị/phản ứng
8	ADN chiết (khuôn): lá của các mẫu cần được phân tích	200 ng ADN hệ gen	
	Đối chứng âm	50 ng ADN hệ gen ngô không chuyển gen	
	Đối chứng âm	không có khuôn ADN nào (dung dịch trong đó ADN được tái tạo huyền phù)	
	Đối chứng dương	50 ng ADN hệ gen ngô chứa DBN9858	

Bảng 3. Các điều kiện của thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer 9700

Số lượng chu kỳ	Các thiết lập
1	94°C trong 3 phút
34	94°C trong 30 giây
	64°C trong 30 giây
	72°C trong 1 phút
1	72°C trong 10 phút

Trộn đều, nếu cần thiết (không có mặt nóng ở trên thiết bị luân nhiệt), 1-2 giọt dầu khoáng có thể được bổ sung trên mặt của mỗi một dịch phản ứng. PCR được thực hiện trên thiết bị Stratagene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA), MJ Engine (MJ R-Biorad, Hercules, CA), Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA) hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) sử dụng các thông số luân chuyển ở trên (Bảng 3). Thiết bị luân nhiệt MJ Engine hoặc Eppendorf Mastercycler Gradient cần được vận hành theo phương thức đã tính toán. Thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer 9700 được vận hành với tốc độ lên được hiệu chỉnh ở mức tối đa.

Kết quả thực nghiệm cho thấy rằng, khi các đoạn mồi 5 và 6 (SEQ ID NO: 8 và 9) được sử dụng trong phản ứng PCR đối với ADN hệ gen của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, chúng dẫn đến sản phẩm khuếch đại của đoạn có kích cỡ 1301 bp, và khi chúng được sử dụng trong các phản ứng PCR đối với ADN hệ gen ngô không được biến nạp và ADN hệ gen ngô không phải DBN9858, không có đoạn nào được khuếch đại; và khi các đoạn mồi 7 và 8 (SEQ ID NO: 10 và 11) được sử dụng trong phản ứng PCR đối với ADN hệ gen của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, chúng dẫn đến sản phẩm khuếch đại của đoạn có kích cỡ 1310 bp, và khi chúng được sử dụng trong các phản ứng PCR đối với ADN hệ gen ngô không được biến nạp và ADN hệ gen ngô không phải DBN9858, không có đoạn nào được khuếch đại.

Thử nghiệm tiếp hợp giao tử PCR cũng có thể được sử dụng để nhận diện xem vật liệu xuất phát từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Đoạn mồi 9 (SEQ ID NO: 12), đoạn mồi 10 (SEQ ID NO: 13) và đoạn mồi 11 (SEQ ID NO: 14) được sử dụng trong phản ứng khuếch đại để tạo ra amplicon chẩn đoán phát hiện đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Các điều kiện khuếch đại ADN được minh họa trong bảng 4 và bảng 5 có thể được sử dụng trong thử nghiệm tiếp hợp giao tử ở trên để tạo ra amplicon chẩn đoán phát hiện đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Bảng 4. Dung dịch phản ứng của thử nghiệm tiếp hợp giao tử.

Bước	Tác nhân phản ứng	Lượng	Chú thích
1	Nước không chứa nucleaza	bổ sung tới thể tích cuối cùng 10 μ L	
2	2 X Universal Master Mix (Applied Biosystems cat no. 4304437)	5 μ L	1 X nồng độ cuối cùng
3	Đoạn mồi 9 SEQ ID NO:12, đoạn mồi 10 SEQ ID NO:13 và đoạn mồi 11 SEQ ID NO: 14 (được tái tạo huyền phù trong nước không chứa nucleaza tới nồng độ 10 μ M)	0,3 μ L	nồng độ cuối cùng 0,1 μ M
4	<i>REDTaq</i> ADN polymeraza (1 đơn vị / μ L)	1,0 μ L (được khuyến cáo chuyển các ống hút trước bước tiếp theo)	1 đơn vị/phản ứng
5	ADN chiết (khuôn): lá của các mẫu cần được phân tích	200 ng ADN hệ gen	
	Đối chứng âm	50 ng ADN hệ gen ngô không chuyển gen	
	Đối chứng âm	không có khuôn ADN nào (dung dịch trong đó ADN được tái tạo huyền phù)	
	Đối chứng dương	50 ng ADN hệ gen ngô chứa DBN9858	

Bảng 5. Các điều kiện của thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer9700 đối với thử nghiệm tiếp hợp giao tử.

Số lượng chu kỳ	Các thiết lập
1	95°C trong 10 phút
10	95°C trong 15 giây
	64°C trong 1 phút (-1°C /chu kỳ)
30	95°C trong 15 giây
	54°C trong 1 phút
1	Nhúng ở nhiệt độ 10°C

PCR được thực hiện trên thiết bị luân nhiệt Stratagene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA), MJ Engine (MJ R-Biorad, Hercules, CA), Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA) hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) sử dụng các thông số luân chuyển ở trên (Bảng 5). Thiết bị luân nhiệt MJ Engine hoặc Eppendorf Mastercycler Gradient cần được vận hành theo phương thức tính toán. Thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer 9700 được vận hành với tốc độ lên được hiệu chỉnh ở mức tối đa.

Trong phản ứng khuếch đại, mẫu sinh học chứa ADN khuôn mẫu chứa ADN để chẩn đoán phát hiện sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu. Theo cách khác, phản ứng sẽ bao gồm hai amplicon ADN khác nhau được tạo ra bởi mẫu sinh học chứa ADN xuất phát từ hệ gen ngô. ADN xuất phát từ hệ gen ngô là dị hợp tử đối với các alen tương ứng của ADN xen vào được có mặt trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Hai amplicon khác nhau này sẽ tương ứng với amplicon thứ nhất mà nó xuất phát từ locut của hệ gen ngô kiểu dại và amplicon thứ hai để chẩn đoán phát hiện sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 DNA. Nếu chỉ một amplicon duy nhất tương ứng với amplicon thứ hai như được mô tả đối với hệ gen lai được tạo ra cho mẫu ADN ngô, sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu có thể được chẩn đoán phát hiện và được khẳng định và mẫu này được tạo ra bởi hạt ngô mà hạt này đồng hợp tử đối với các alen tương ứng của ADN xen vào được có mặt trong ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858.

Cần lưu ý rằng, cặp đoạn môi của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 được sử dụng để tạo ra các amplicon mà chúng được chẩn đoán phát hiện đối với ADN hệ gen của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Các cặp đoạn môi này bao gồm, nhưng không bị giới hạn bởi, các đoạn môi 5 và 6 (SEQ ID NO: 8 và 9) và các đoạn môi 7 và 8 (SEQ ID NO: 10 và 11) để sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN. Ngoài ra, đoạn môi đối chứng để khuếch đại gen nội sinh ở ngô 12 và 13 (SEQ ID NO: 22 và 23) được bao gồm làm nội chuẩn về các điều kiện phản ứng. Ngoài ra, các đoạn môi đối chứng 12 và 13 (SEQ ID

NO: 22 và 23) để khuếch đại gen nội sinh ở ngô được bao gồm làm nội chuẩn về các điều kiện phản ứng. Việc phân tích về các mẫu chiết ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 cần bao gồm cả đối chứng của phần chiết ADN mô dương tính ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, đối chứng của phần chiết ADN âm tính ngô mang sự kiện DBN9858 không chuyển gen và đối chứng âm không chứa phần chiết ADN ngô khuôn mẫu nào. Ngoài các cặp đoạn mồi này, các cặp đoạn mồi bất kỳ từ SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, hoặc trình tự bổ sung của nó cũng có thể được sử dụng. Khi được sử dụng cho phản ứng khuếch đại ADN, chúng lần lượt tạo ra các amplicon bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 mà chúng để chẩn đoán phát hiện các mô xuất phát từ ngô chuyển gen DBN9858. Các điều kiện khuếch đại ADN được minh họa trong các bảng từ bảng 2 đến bảng 5 có thể được sử dụng để tạo ra các amplicon chẩn đoán phát hiện đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 bằng các cặp đoạn mồi thích hợp. Phần chiết của ngô hoặc ADN hạt hoặc sản phẩm bất nguồn từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 mà chúng tạo ra các amplicon chẩn đoán phát hiện đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 khi được thử nghiệm trong phương pháp khuếch đại ADN, nó được cho là chứa ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, có thể được sử dụng làm khuôn mẫu trong khuếch đại để xác định xem ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có mặt hay không.

Ví dụ 4. Phát hiện ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 thông qua phương pháp lai thẩm tách Southern

4.1. ADN được chiết trong phương pháp lai thẩm tách Southern

Các sự kiện biến nạp đồng hợp tử của các thể hệ T4 và T5 được sử dụng trong phân tích thẩm tách Southern. Khoảng 5 đến 10 g mô thực vật được nghiền trong nitor lỏng sử dụng cối nghiền và chày. Mô thực vật được tái tạo huyền phù trong 12,5ml dung dịch đệm chiết A (Tris 0,2 M có độ pH 8,0, EDTA 50 mM, NaCl 0,25 M, β -mercaptoetanol 0,1% thể tích/thể tích, polyvinyl-pyrrolidon 2,5% trọng lượng/thể tích), và được ly tâm trong thời gian 10 phút với tốc độ 4000 vòng/phút (2755g). Sau khi loại bỏ lớp nổi trên bề mặt, viên kết được tái tạo huyền phù trong 2,5 ml dung dịch đệm chiết B (Tris 0,2 M có độ pH 8,0, EDTA 50 mM, NaCl 0,5 M, β -mercaptoetanol 1% thể tích/thể tích, polyvinyl-pyrrolidon 2,5% trọng lượng/thể tích, parkosyl 3%, etanol 20%) và

được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút. Trong quá trình ủ, mẫu được trộn một lần bằng vòng vô trùng. Sau khi ủ, một thể tích tương đương của clorofom/rượu isoamyl (tỷ lệ 24:1) được bổ sung, được trộn nhẹ nhàng bằng cách lộn ngược và được ly tâm trong thời gian 20 phút với tốc độ 4000 vòng/phút. Lớp nước được tập hợp, và 0,54 thể tích của isopropanol được bổ sung vào đó, tiếp theo bằng cách ly tâm trong thời gian 5 phút với tốc độ 4000 vòng/phút để làm kết tủa ADN. Lớp nổi trên bề mặt được loại bỏ và viên kết ADN được tái tạo huyền phù trong 500 μ L TE. Để làm thoái biến ARN bất kỳ nào có mặt, ADN được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 30 phút với 1 μ L men RNaza A 30mg/ml, ly tâm trong thời gian 5 phút với tốc độ 4000 vòng/phút và được làm kết tủa bằng cách ly tâm với tốc độ 14000 vòng/phút trong thời gian 10 phút với sự có mặt của 0,5 thể tích của amoni axetat 7,5 M và 0,54 thể tích của isopropanol. Sau khi loại bỏ lớp nổi trên bề mặt, viên kết được rửa bằng 500 μ L (tỷ lệ khối lượng) etanol 70%, và được làm khô trước khi tái huyền phù trong 100 μ L dung dịch đệm TE.

4.2. Phân cắt bằng enzym giới hạn

ADN được định lượng sử dụng quang phổ kế hoặc huỳnh quang kế (sử dụng 1 x TNE và chất nhuộm Hoechst).

Trong 100 μ L hệ phản ứng, 5 μ g ADN được phân cắt mỗi một lần. ADN hệ gen được phân cắt lần lượt bằng các enzym giới hạn *Sac* I và *Hind* III, và trình tự một phần của *EPSPS* và *PAT* trong T-ADN làm đoạn dò. Các phần phân cắt được ủ qua đêm ở nhiệt độ thích hợp đối với mỗi một enzym. Các mẫu được quay với tốc độ chậm không để giảm thể tích còn 30 μ L.

4.3. Điện di trên gel

Thuốc nhuộm nạp xanh bromophenol được bổ sung vào mỗi một mẫu xuất phát từ ví dụ 4,2 nêu trên và mỗi một mẫu được nạp lên gel agarosa 0,7% chứa ethidi bromua. Kỹ thuật điện di được thực hiện trong dung dịch đệm điện di TBE và gel điện di được hoạt động tại điện thế 20 vôn qua đêm.

Gel được rửa trong HCl 0,25 M trong thời gian 15 phút để khử purin của ADN, và tiếp theo, được rửa bằng nước. Phương pháp thâm tách southern được thiết lập như sau: 20 tờ giấy thấm khô dày được đặt lên khay và 4 tờ giấy thấm khô mỏng được đặt thêm lên trên. Một tờ giấy thấm mỏng được làm ẩm trước

bằng NaOH 0,4 M và được đặt lên trên chồng giấy, tiếp theo bằng tấm màng vận chuyển Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN303B) cũng được làm ẩm trước bằng NaOH 0,4 M. Gel được đặt lên trên để đảm bảo rằng, không có các bong bóng không khí giữa gel và màng. Ba tờ giấy thấm được nhúng trước khác được đặt ở trên gel và khay đệm được nạp bằng NaOH 0,4 M. Đóng gel và khay đệm được kết nối sử dụng bắc được nhúng trước trong NaOH 0,4 M, và ADN được chuyển sang màng. Sự vận chuyển ADN diễn ra trong thời gian khoảng 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi vận chuyển, màng Hybond được rửa trong dung dịch 2 x SSC trong thời gian 10 giây và ADN được liên kết với màng thông qua sự liên kết chéo UV.

4.4. Phép lai

Trình tự ADN thích hợp được khuếch đại sử dụng phương pháp PCR để điều chế các đoạn dò. Các đoạn dò ADN là SEQ ID NO: 24 và SEQ ID NO: 25, hoặc tương đồng hoặc bổ trợ cho các trình tự nêu trên. 25 ng đoạn dò ADN trong 45 µL TE được đun sôi trong thời gian 5 phút, được đặt trên nước đá trong thời gian 7 phút, và tiếp theo, được chuyển sang ống Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, #RPN1633). Sau khi bổ sung 5 µL dCTP đánh dấu bằng ³²P vào ống Rediprime, đoạn dò được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 15 phút. Đoạn dò được tinh chế bằng cách ly tâm nhờ cột tốc độ quay cao (microspin) G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, #27-5330-01) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất để loại bỏ các dNTP không sắp hợp. Hoạt động của đoạn dò được xác định sử dụng máy đếm nhấp nháy.

Màng Hybond được lai sơ bộ thông qua việc làm ướt bằng 20 mL dung dịch lai sơ bộ làm ẩm trước Church (Na₃PO₄ 500 mM, EDTA 1 mM, SDS 7%, BSA 1%) ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 30 phút. Đoạn dò đánh dấu được đun sôi trong thời gian 5 phút và được đặt trên nước đá trong thời gian 10 phút. Một lượng đoạn dò thích hợp (1 triệu trên 1 mL dung dịch đệm lai sơ bộ) được bổ sung vào dung dịch đệm lai sơ bộ và sự lai xuất hiện ở nhiệt độ 65°C trong thời gian qua đêm. Ở ngày tiếp theo, dung dịch đệm lai được loại bỏ, và sau khi rửa bằng 20 mL dung dịch rửa Church 1 (Na₃PO₄ 40 mM, EDTA 1 mM, SDS 5%, BSA 0,5%), màng được rửa trong 150 ml dung dịch rửa Church 1 ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 20 phút. Quá trình này được lặp lại hai lần bằng dung dịch

rửa Church 2 (Na_3PO_4 40 mM, EDTA 1 mM, SDS 1%). Màng được cho tiếp xúc với màn huỳnh quang hoặc phim X quang để phát hiện xem đoạn dò đã liên kết với vị trí nào.

Ba mẫu đối chứng được bao gồm cho mỗi một phương pháp thẩm tách Southern: (1) ADN từ thể phân lập âm tính (không được biến nạp), nó được sử dụng để nhận diện trình tự ngô nội sinh bất kỳ mà nó có thể lai với đoạn dò đặc hiệu yếu tố; (2) ADN từ thể phân lập âm tính mà DBN10006 phân cắt bằng *Hind* III khi đã được đưa vào trong đó, lượng của nó tương đương với một bản sao căn cứ theo độ dài của đoạn dò để chứng minh độ nhạy của thực nghiệm khi phát hiện bản sao gen đơn bên trong hệ gen ngô; và (3) plasmit DBN10006 phân cắt bằng *Hind* III mà tương đương với một bản sao căn cứ theo độ dài của đoạn dò, được sử dụng làm đối chứng dương trong phép lai để chứng minh độ nhạy của thực nghiệm.

Dữ liệu lai cung cấp các bằng chứng vững vàng hỗ trợ cho phân tích PCR TaqMan™, tức là, ngô DBN9858 chứa bản sao duy nhất của các gen *EPSPS* và *PAT*. Bằng đoạn dò EPSPS này, các dải đơn kích thước khoảng 4 kb và 11 kb lần lượt được tạo ra bằng sự phân cắt enzym *Sac* I và *Hind* III; với đoạn dò PAT, các dải đơn kích thước khoảng 3,5 kb và 1,8 kb lần lượt được tạo ra bằng sự phân cắt enzym *Sac* I và *Hind* III. Điều này chỉ ra rằng, *EPSPS* và *PAT* có mặt trong sự kiện biến nạp ngô DBN9858 trong mỗi một bản sao.

Ví dụ 5. Phát hiện khả năng chịu thuốc diệt cỏ của sự kiện

Thuốc diệt cỏ Roundup (41% tác nhân muối glyphosat isopropyl amoni dạng nước) và thuốc diệt cỏ Basta (thành phần hoạt tính là 18% glufosinat) được sử dụng trong thử nghiệm phun này. Thiết kế phong bế ngẫu nhiên được sử dụng, thực hiện trong ba lần. Vùng diện tích là 15 m² (5 m x 3 m), khoảng cách lần là 60 cm, và khoảng cách thực vật là 25 cm, với việc trồng và quản lý thông thường. Có một vùng phân cách rộng 1 m giữa các vùng. Ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 được xử lý như sau: 1) không phun; 2) phun thuốc diệt cỏ Roundup ở giai đoạn lá V3 với liều lượng 1680 g a.e./ha (a.e./ha để chỉ “đương lượng thành phần hoạt tính axit trên hecta”), sau đó lại phun thuốc diệt cỏ Roundup ở giai đoạn V8 với liều lượng tương tự; 3) phun thuốc diệt cỏ Basta ở giai đoạn lá V3 với liều lượng 800 g a.i./ha (a.i./ha để chỉ “đương lượng thành

phần hoạt tính trên hecta”), sau đó, lại phun thuốc diệt cỏ Basta ở giai đoạn V8 với liều lượng tương tự. Lưu ý rằng, thuốc diệt cỏ glyphosat với hàm lượng và dạng liều bào chế khác nhau có thể được chuyển đổi thành lượng tương đương của axit glyphosat, và dung dịch glufosinat với nồng độ khác nhau có thể được chuyển đổi thành lượng tương đương của thành phần hoạt tính glufosinat nêu trên, toàn bộ áp dụng cho các kết luận dưới đây.

Triệu chứng gây độc cho thực vật được khảo sát lần lượt trong 1 tuần và 2 tuần sau khi sử dụng và sản lượng ngô của diện tích trồng được xác định khi thu hoạch. Sự phân loại các triệu chứng gây độc cho thực vật như được thể hiện trong bảng 6. Tỷ lệ gây tổn thương của thuốc diệt cỏ được sử dụng làm chỉ số để đánh giá khả năng chịu được thuốc diệt cỏ của các thể biến nạp, cụ thể, tỷ lệ gây tổn thương của thuốc diệt cỏ (%) = Σ (số thực vật bị tổn thương cùng mức x số mức) / (tổng số thực vật x mức cao nhất); trong đó tỷ lệ gây tổn thương của thuốc diệt cỏ bao gồm tỷ lệ gây tổn thương của glyphosat và tỷ lệ gây tổn thương của glufosinat, và tỷ lệ gây tổn thương của thuốc diệt cỏ được xác định trên cơ sở các kết quả khảo sát về khả năng gây độc thực vật 2 tuần sau khi xử lý bằng glyphosat hoặc glufosinat. Sản lượng ngô của mỗi một diện tích được xác định bằng cách cân tổng sản lượng (trọng lượng) hạt ngô của ba luống ở giữa vùng. Sự chênh lệch về sản lượng giữa các vùng xử lý khác nhau được xác định theo tỷ lệ phần trăm sản lượng, tỷ lệ phần trăm sản lượng (%) = sản lượng phun / sản lượng không phun. Các kết quả về khả năng dung nạp của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 đối với thuốc diệt cỏ và kết quả về sản lượng ngô được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 6. Các tiêu chuẩn phân loại về mức độ khả năng gây độc thực vật của thuốc diệt cỏ đối với ngô

Mức độ gây độc thực vật	Mô tả triệu chứng
1	Sinh trưởng bình thường, không có bất kỳ triệu chứng nào về khả năng gây độc thực vật
2	Khả năng gây độc thực vật nhẹ, khả năng gây độc thực vật dưới 10%
3	Khả năng gây độc thực vật vừa phải, có thể được phục hồi

	sau đó, không ảnh hưởng đến năng suất
4	Khả năng gây độc thực vật nặng, khó phục hồi, dẫn đến giảm năng suất
5	Khả năng gây độc thực vật trầm trọng, không thể phục hồi, dẫn đến giảm năng suất rõ rệt hoặc không có năng suất

Bảng 7. Kết quả về khả năng chịu của ngô chuyển gen DBN9858 đối với thuốc diệt cỏ và kết quả về sản lượng ngô

Hạng mục/Thực vật	DBN9858
tỷ lệ gây tổn thương của thuốc diệt cỏ (%) (không phun)	0
tỷ lệ gây tổn thương của glyphosat (%)	0
tỷ lệ gây tổn thương của glufosinat (%)	0
tỷ lệ năng suất (%) (glyphosat)	100,1
tỷ lệ năng suất (%) (glufosinat)	101

Các kết quả chứng minh rằng, về tỷ lệ gây tổn thương của thuốc diệt cỏ (glyphosat và glufosinat), 1) tỷ lệ tổn thương của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 gần như là zero trong điều kiện xử lý thuốc diệt cỏ glyphosat (1680 g a.e./ha); và tỷ lệ tổn thương của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 cũng gần như là bằng không trong điều kiện xử lý thuốc diệt cỏ glufosinat (800 g a.i./ha); như vậy, ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu thuốc diệt cỏ (glyphosat và glufosinat) tốt.

Về năng suất: ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 không hề chênh lệch đáng kể về năng suất trong 3 phương thức xử lý: không phun, thuốc diệt cỏ glyphosat (1680 g a.e./ha) và thuốc diệt cỏ glufosinat (800 g a.i./ha); thay vào đó, sau khi phun thuốc diệt cỏ, năng suất của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 tăng lên chút ít, do đó cho thấy thêm rằng, ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có khả năng chịu thuốc diệt cỏ (glyphosat và glufosinat) tốt.

Ví dụ 6

Các sản phẩm như sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp có thể được tạo ra bằng ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858. Nếu như lượng biểu hiện đầy đủ được phát hiện trong các sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp, các sản phẩm

hoặc hàng hóa nông nghiệp được kỳ vọng chứa trình tự nucleotit mà có thể phát hiện sự có mặt của nguyên liệu ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong các sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp. Các sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp bao gồm nhưng không bị giới hạn bởi dầu ngô, bột ngô, bột ngô mịn, gluten ngô, bánh ngô, tinh bột ngô, và thực phẩm khác bất kỳ mà sẽ được sử dụng làm nguồn thực phẩm để tiêu thụ cho động vật hoặc theo cách khác, làm chất làm nở hoặc các thành phần trong chế phẩm mỹ phẩm để sử dụng làm mỹ phẩm, v.v.. Phương pháp và/hoặc bộ kit phát hiện axit nucleic dựa vào cặp đoạn dò hoặc đoạn mồi có thể được phát triển để phát hiện trình tự nucleotit của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 như được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO 2 trong một mẫu sinh học để chẩn đoán phát hiện sự có mặt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, trong đó trình tự đoạn dò hoặc trình tự đoạn mồi được lựa chọn từ trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5.

Tóm lại, ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 theo sáng chế có khả năng chịu thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat tốt và không ảnh hưởng đến năng suất và phương pháp phát hiện có thể nhận dạng một cách chính xác và nhanh chóng phân tử ADN của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 có chứa trong mẫu sinh học hay không.

Đối với hạt của ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, việc ký thác đã được thực hiện tại trung tâm giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (China General Microbiological Culture Collection Center - viết tắt là CGMCC, đại chỉ: Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No.1 Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing, zip code 100101) vào ngày 24/12/2014 với tên hàng mục: ngô (*Zea mays*), số ký thác CGMCC No.10212. Việc ký thác sẽ được tiến hành ký thác vào trung tâm lưu ký trong thời gian 30 năm.

Sau cùng, cần lưu ý rằng, phần ví dụ ở trên được cung cấp chỉ để minh họa các giải pháp kỹ thuật theo sáng chế và không làm giới hạn sáng chế. Mặc dù sáng chế đã được mô tả một cách chi tiết có tham chiếu đến các ví dụ ưu tiên,

nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng, bất kỳ sự cải biến hoặc thay thế tương đương nào đều có thể được tiến hành đối với các giải pháp kỹ thuật theo sáng chế mà không trệch khỏi tinh thần và phạm vi của các giải pháp kỹ thuật của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic có trình tự axit nucleic sau đây, trong đó trình tự axit nucleic này bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó trình tự axit nucleic thu được từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.
2. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, trong đó trình tự axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó.
3. Phân tử axit nucleic theo điểm 2, trong đó trình tự axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó.
4. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN tương ứng với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu bao gồm các bước:
 - cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với ít nhất hai đoạn mồi để khuếch đại đơn vị siêu sao chép trong phản ứng khuếch đại axit nucleic;
 - tiến hành phản ứng khuếch đại axit nucleic; và
 - phát hiện sự có mặt của đơn vị siêu sao chép;
 - trong đó đơn vị siêu sao chép bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó; và
 - trong đó đơn vị siêu sao chép thu được từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 này được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó đơn vị siêu sao chép còn bao gồm SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.
6. Phương pháp theo điểm 4 hoặc 5, trong đó các đoạn mồi bao gồm đoạn mồi thứ nhất được lựa chọn từ SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID

NO: 8 và SEQ ID NO: 10, và đoạn mỗi thứ hai được lựa chọn từ SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 11.

7. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN tương ứng với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với đoạn dò bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó; trong đó đoạn dò thu được từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 này được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center;

cho mẫu cần được phát hiện và đoạn dò vào môi trường lai nghiêm ngặt; và phát hiện sự lai của mẫu cần được phát hiện bằng đoạn dò.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó đoạn dò còn bao gồm SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

9. Phương pháp theo điểm 7 hoặc 8, trong đó ít nhất một đoạn dò được đánh dấu bằng ít nhất một nhóm huỳnh quang.

10. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN tương ứng với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 trong mẫu bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với tác nhân đánh dấu axit nucleic bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó; trong đó tác nhân đánh dấu axit nucleic thu được từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 này được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center;

cho mẫu cần được phát hiện và tác nhân đánh dấu axit nucleic vào môi trường lai nghiêm ngặt; và

phát hiện kết quả lai giữa mẫu và tác nhân đánh dấu axit nucleic, và sự phân tích chọn giống nhờ tác nhân đánh dấu axit nucleic được sử dụng để xác định xem khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc khả năng chịu

được thuốc diệt cỏ glufosinat có quan hệ về mặt di truyền với tác nhân đánh dấu axit nucleic hay không.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó tác nhân đánh dấu axit nucleic còn bao gồm SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

12. Bộ kit phát hiện ADN bao gồm ít nhất là phân tử ADN, trong đó phân tử ADN này bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, mà được dùng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò ADN đặc hiệu đối với ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 hoặc thể hệ con của nó, trong đó phân tử ADN thu được từ ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, và ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 này được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.

13. Bộ kit phát hiện ADN theo điểm 12, trong đó phân tử ADN còn bao gồm SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó, và trong đó phân tử ADN được sử dụng làm đoạn dò.

14. Phương pháp tạo ra cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat bao gồm các bước:

đưa trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 vào trong hệ gen của cây ngô, và sao cho hệ gen của cây ngô chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 5;

chọn lọc cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat.

15. Phương pháp theo điểm 14 bao gồm các bước:

lai chéo giới tính cây ngô gốc thứ nhất của ngô mang hiện tượng chuyển gen DBN9858 chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat với cây ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat, và bằng cách đó tạo ra số lượng lớn thực vật thể hệ con;

tiến hành xử lý thực vật thể hệ con bằng thuốc diệt cỏ glyphosat; và
lựa chọn thực vật thể hệ con chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat;

trong đó ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.

16. Phương pháp tạo ra cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm các bước:

đưa trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 vào trong hệ gen của cây ngô, và sao cho hệ gen của cây ngô chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 5;

chọn lọc cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat.

17. Phương pháp theo điểm 16 bao gồm các bước:

lai chéo giới tính cây ngô gốc thứ nhất của ngô mang hiện tượng chuyển gen DBN9858 chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat với cây ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat, và bằng cách đó tạo ra số lượng lớn thực vật thể hệ con;

tiến hành xử lý thực vật thể hệ con bằng thuốc diệt cỏ glufosinat; và

lựa chọn thực vật thể hệ con chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat;

trong đó ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.

18. Phương pháp tạo ra cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm các bước:

đưa trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 vào trong hệ gen của cây ngô, và sao cho hệ gen của cây ngô chứa trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744

của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 5;

chọn lọc cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat.

19. Phương pháp theo điểm 18 bao gồm các bước:

lai chéo giới tính cây ngô gốc thứ nhất của ngô mang hiện tượng chuyển gen DBN9858 chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat với cây ngô gốc thứ hai không có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, và bằng cách đó tạo ra số lượng lớn thực vật thể hệ con;

tiến hành xử lý thực vật thể hệ con bằng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat; và

lựa chọn thực vật thể hệ con chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat;

trong đó ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858 được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.

20. Phương pháp canh tác cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat bao gồm các bước:

tiến hành gieo trồng ít nhất một hạt ngô mà hạt này chứa trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu trong hệ gen của nó, trong đó trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu gồm SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 5;

để cho hạt ngô phát triển thành cây ngô; và

phun lên cây ngô lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glyphosat, và thu được cây ngô có mức tổn hại thực vật thấp hơn so với các cây không có trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu.

21. Phương pháp canh tác cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm

các bước:

tiến hành gieo trồng ít nhất một hạt ngô mà hạt này chứa trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu trong hệ gen của nó, trong đó trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu gồm SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 5;

để cho hạt ngô phát triển thành cây ngô; và

phun lên cây ngô lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glufosinat, và thu được cây ngô có mức tổn hại thực vật thấp hơn so với các cây không có trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu.

22. Phương pháp canh tác cây ngô chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm các bước:

tiến hành gieo trồng ít nhất một hạt ngô mà hạt này chứa trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu trong hệ gen của nó, trong đó trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu gồm SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của SEQ ID NO: 5;

để cho hạt ngô phát triển thành cây ngô; và

phun lên cây ngô lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat, và thu lấy cây ngô có mức tổn hại thực vật thấp hơn so với các cây không có trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu.

23. Phương pháp bảo vệ thực vật tránh các tổn hại được gây ra bởi thuốc diệt cỏ bao gồm các bước:

phun thuốc diệt cỏ chứa lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat lên cánh đồng mà ít nhất là cây ngô chuyển gen được trồng trên cánh đồng này, trong đó trong hệ gen của cây ngô chuyển gen này chứa SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây ngô chuyển gen chứa SEQ ID NO: 5 trong hệ gen của nó; và cây ngô chuyển gen này chịu được thuốc

diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

24. Phương pháp kiểm soát cỏ trên cánh đồng bao gồm các bước:

phun thuốc diệt cỏ chứa lượng hữu hiệu của glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng mà ít nhất là cây ngô chuyển gen được trồng trên cánh đồng này, trong đó trong hệ gen của cây ngô chuyển gen chứa SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây ngô chuyển gen chứa SEQ ID NO: 5 trong hệ gen của nó; và cây ngô chuyển gen này có khả năng chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

25. Phương pháp kiểm soát cỏ kháng glyphosat trên cánh đồng trồng thực vật chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat bao gồm bước:

phun thuốc diệt cỏ chứa lượng hiệu quả của thuốc diệt cỏ glufosinat lên cánh đồng mà ít nhất là cây ngô chuyển gen được trồng trên đó, trong đó trong hệ gen của cây ngô chuyển gen bao gồm SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây ngô chuyển gen chứa SEQ ID NO: 5 trong hệ gen của nó; và cây ngô chuyển gen này chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat cũng chịu được thuốc diệt cỏ glufosinat.

26. Phương pháp kéo dài tính kháng côn trùng bao gồm bước trồng ít nhất là cây ngô chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat trên cánh đồng mà cây ngô kháng côn trùng được trồng trên đó, trong đó trong hệ gen của cây ngô chuyển gen chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm SEQ ID NO: 1, trình tự axit nucleic gồm các nucleotit 1157-5744 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây ngô chuyển gen chứa SEQ ID NO: 5 trong hệ gen của nó.

27. Sản phẩm nông nghiệp hoặc hàng hóa nông nghiệp được tạo ra bởi ngô mang sự kiện chuyển gen DBN9858, trong đó sản phẩm nông nghiệp hoặc hàng hóa nông nghiệp là bột ngô, bột ngô mịn, dầu ngô, tinh bột ngô, gluten ngô, bánh ngô, mỹ phẩm hoặc chất độn; trong đó ngô mang sự kiện chuyển gen

DBN9858 được lưu giữ ở dạng hạt giống dưới số đăng kí CGMCC No. 10212 ở China General Microbiological Culture Collection Center.

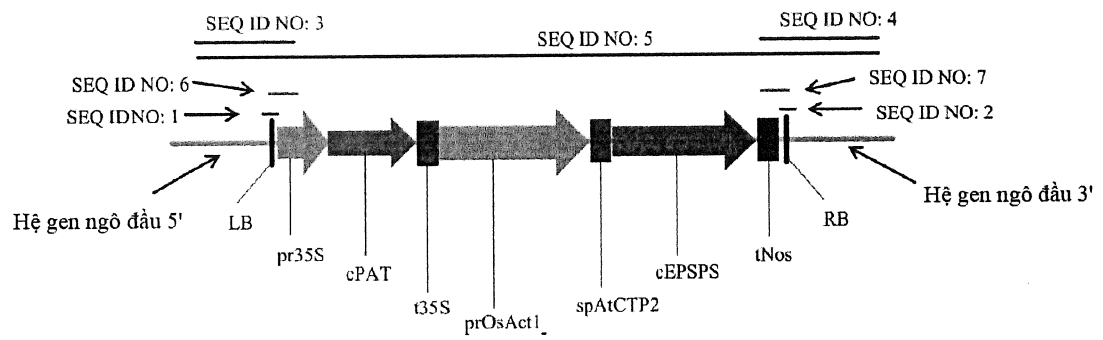


Fig. 1

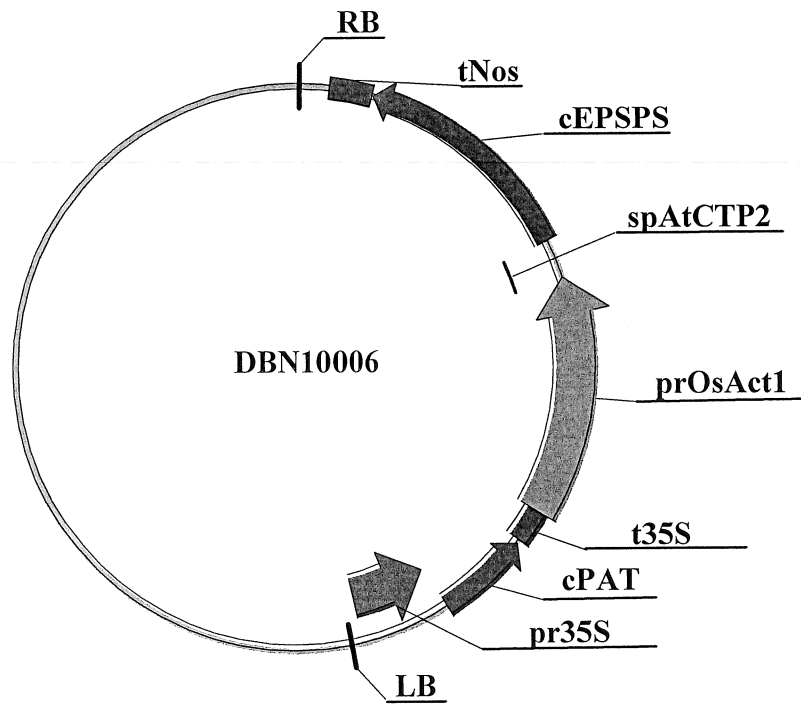


Fig. 2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.
 <120> PHÂN TỬ AXIT NUCLEIC ĐỂ PHÁT HIỆN NGÔ CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ DBN9858,
 PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN NGÔ NÀY VÀ BỘ KIT PHÁT HIỆN ADN

<130> DBNBC79
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 11 nucleotit ở mỗi bên của vị trí xen vào của đoạn gen chuyển đầu 5'
 và ADN hệ gen ngô trong DBN9858

<400> 1
 aatcgatcaa aggatatatt gt 22

<210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> 11 nucleotit ở mỗi bên của vị trí xen vào của đoạn gen chuyển đầu 3'
 và ADN hệ gen ngô trong DBN9858

<400> 2
 ctcgtcagcc agttgagagc ag 22

<210> 3
 <211> 1301
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự nucleotit nằm gần điểm nối xen vào tại đầu 5' của trình tự
 xen vào trong DBN9858

<400> 3
 atgccctgcc tgactcactg aagacctgca ttctcatttgc cttctgatta ttttttaaatt 60
 gccttctgat tattttttaa ttgtgccaca ggaaagatta ctaccaggag ggcaaccgcg 120
 tatacagtga gctggatgtt catgacgcct ttcggagagc tctcaacacc tgggctaagt 180
 ggggttgattc caatgtgaac cccaagaaaa ccactgtgtt tttcagaggc tactctgcat 240
 cccatttcag gtacgcaaag ctattttaga acctctgcaa gttcagcaag aatgtgctct 300
 atgagttact ggtgtttact aactgtttct gttatgcagt gggggtcaat ggaattcggg 360
 cggcagttgt gacagggaaa cagagccaat aacggatgac cagtacctca cgccataccc 420
 aacaaagatg agcatttttg aggaggtgct cggggggatg aaaactcccg ttgtgtacct 480
 gaacataaca aggatgactg actacaggaa ggaggccac ctttcagtct accgcaagca 540
 gaagttgacc gaagaggaga ggaaatcgcc tgagctatac caggactgca gccactggtg 600
 ccttcctgga gtaccggact cctggaacga acttctctac gcacagattt tgctgacaca 660


```

gcagcatggg atgcaacaat aaaggcaagt gtggacttgt tcttgtatat gaaatgtttt 720
cagacgtcaa gctgcatagg atacaaatct acatgaatcg atcaaaggga agcttatagtg 780
ataagtgaga ccaagggttt tggaatccat gcatagagta aagcaggcag ttagctctga 840
ataacacgaa atctgtatag gctcgcgatg attatatgat gtaaaacttca tgcctagtta 900
gaagaaaaaa taataagaac aaagagaata gaatagatag tgcactagat gacataggac 960
tataggaggc ccttgttttg tgagactttt gtctgcctgt attgtactaa tatagtattc 1020
tgaattcgta ttcgtatata ctttctggat aatatgaatc gatcaaagga tatattgtgg 1080
tgtaaacaaa ttgacgctta gacaacttaa taacacattg cggatacggc catgctggcc 1140
gccatataaa ggcgcgccat ggagtcaaag attcaaatag aggacctaac agaactcgcc 1200
gtaaagactg gogaacagtt catacagagt ctcttacgac tcaatgacaa gaagaaaatc 1260
ttcgtcaaca tgggtggagca cgacacgctt gtctactcca a 1301

```

<210> 4

<211> 1310

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit nằm gần điểm nối xen vào tại đầu 3' của trình tự xen vào trong DBN9858

<400> 4

```

cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat 60
gattagagtc cgcgaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa 120
ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcggatcc cgtgggtccc 180
gtcccgttta aacctaatac gtcagtgccg gtgagagcgt agctgcctgg aagcggcctc 240
gtcagccagt tgagagcagt gaagaggggc ttcagatcca gggcgcgcaa ggcccaaaca 300
accagcccac cagccttact cgagaatcag cgctcactca ctcgctcccag cggctcgtgac 360
gtaggcgtag ctccattaaa acatgcatgg tgatgctaag caagaaataa atttcatttt 420
attaaaaaaa tgtaataatt ttgtcgggtt agctgagccc gacaaagtaa agactcctag 480
cttgcccggtg tatgctttgt tgtttccctt gaactcgatc gatgacaatc catggaccat 540
gcagcttgct ctggtccttt ccttgtcctt gttgcatcga gttgcccccc cccccccc 600
gtaaccacag aaggattgta ttgtacgttc ccattgctgaa ggacggttga aggataggaa 660
aaggagacga gtaggttcaa gaatctagag agcgtaacgt tctgctccat tgcccatcga 720
cattcaccaa accgaagcat caagccatca accatctcta atggtccatc catccatcca 780
tgcgtatatt tttgaagaag gccgtccata tgccgggtggc ggtacgttta gccattaaac 840
tgtccgtgtg gcctccctca atcatcttcc ttctcttctc ctgacaggac acatcatgtg 900
gactgcatgt agggcagccc aggaatcatg gcacgaaacg catgattcgt tgcgcgtcag 960
gccaccgccc gacatacgaa ggcgccccca cattctgggtg ccggctcatt gcctcgcctc 1020
aagatggcaa aggaccaga ggaacgattg catggatctg tcccactaag gtgggtgttta 1080
gtatgaagaa tcaatccatt ataaataagg tagtgcattc tcagttcatt ccataaagtt 1140
ggtgaaatga actcattcct catgttatta ctattattag cttatgagga ataaaatggt 1200
gatagatcag ctcatccat ttcacgaacc aaacaagaaa gtgaagaata agaagatcat 1260
agttttacctc atttctcaaa ccaaatactc cataaaattt ccgtcctgaa 1310

```

<210> 5

<211> 6890

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự T-ADN toàn bộ, trình tự hệ gen ngô chặn đầu 5' và 3'

<400> 5

```

atgccctgcc tgactcactg aagacctgca tttcatttgc cttctgatta tttttaaatt 60

```

gcctttctgat	tattttttaaa	ttgtgccaca	ggaaagatta	ctaccaggag	ggcaaccgcg	120
tatacagtga	gctggatggt	catgacgcct	ttcggagagc	tctcaacacc	tgggctaagt	180
gggttgattc	caatgtgaac	cccaagaaaa	ccactgtgtt	tttcagaggc	tactctgcat	240
cccatttcag	gtacgcaaag	ctatttttaga	acctctgcaa	gttcagcaag	aatgtgctct	300
atgagttact	ggtgtttact	aaactgtttct	gttatgcagt	gggggtcaat	ggaattcggg	360
cggcagttgt	gacagggaaa	cagagccaat	aacggatgac	cagtacctca	cgccataccc	420
aacaaagatg	agcatttttg	aggaggtgct	ccgggggatg	aaaactcccc	ttgtgtacct	480
gaacataaca	aggatgactg	actacaggaa	ggaggcccac	ccttcagtct	accgcaagca	540
gaagttgacc	gaagaggaga	ggaaatcgcc	tgagctatac	caggactgca	gccactgggtg	600
ccttcctgga	gtaccggact	cctggaacga	acttctctac	gcacagattt	tgctgacaca	660
gcagcatggg	atgcaacaat	aaaggcaagt	gtggacttgt	tcttgatat	gaaatgtttt	720
cagacgtcaa	gctgcatagg	atacaaatct	acatgaatcg	atcaaaggga	agcttatagt	780
ataagtgaga	ccaagggttt	tggaatccat	gcatagagta	aagcaggcag	ttagctctga	840
ataacacgaa	atctgtatag	gctcgatagg	attatatgat	gtaaacttca	tgctagtta	900
gaagaaaaaa	taataagaac	aaagagaata	gaatagatag	tgactagat	gacataggac	960
tataggaggc	ccttggtttg	tgagactttt	gtctgcctgt	attgtactaa	tatagtattc	1020
tgaattcgta	ttcgtatata	ctttctggat	aatatgaatc	gatcaaagga	tatatgtgg	1080
tgtaaacata	ttgacgctta	gacaacttaa	taacacattg	cggatacggc	catgctggcc	1140
gcccataata	ggcgcgccat	ggagtcaaa	attcaaatag	aggacctaac	agaactcgcc	1200
gtaaagactg	gcgaacagtt	catacagagt	ctcttacgac	tcaatgacaa	gaagaaaatc	1260
ttcgtcaaca	tggtggagca	cgacacgctt	gtctactcca	aaaatatcaa	agatacagtc	1320
tcagaagacc	aaagggcaat	tgagactttt	caacaaaggg	taatatccgg	aaacctcctc	1380
ggattccatt	gcccgactat	ctgtcacttt	attgtgaaga	tagtggaata	ggaaggtggc	1440
tcctacaaat	gccatcattg	cgataaagga	aaggccatcg	ttgaagatgc	ctctgccgac	1500
agtgtccca	aagatggacc	cccaccacag	aggagcatcg	tggaaaaaga	agacgttcca	1560
accacgtctt	caaagcaagt	ggattgatgt	gatatctcca	ctgacgtaag	ggatgacgca	1620
caatcccact	atccttcgca	agacccttcc	tctatataag	gaagttcatt	tcatttggag	1680
aggacaggg	acccggggat	ccaccatgtc	tccggagagg	agaccagttg	agattaggcc	1740
agctacagca	gctgatatgg	ccgcggtttg	tgatatcggt	aaccattaca	ttgagacgtc	1800
tacagtgaac	tttaggacag	agccacaaac	accacaagag	tggattgatg	atctagagag	1860
ggtgcaagat	agataccctt	ggttggttgc	tgaggttgag	ggtgttggg	ctggtattgc	1920
ttacgctggg	ccctggaagg	ctaggaacgc	ttacgattgg	acagttgaga	gtactgttta	1980
cgtgtcacat	aggcatcaaa	ggttgggcct	aggatccaca	ttgtacacac	atlttgcttaa	2040
gtctatggag	gcgaaggtt	ttaagtctgt	ggttgctgtt	ataggccttc	caaacgatcc	2100
atctgttagg	ttgcatgagg	ctttgggata	cacagcccgg	ggtacattgc	gcgcagctgg	2160
atacaagcat	ggtggatggc	atgatgttgg	tttttgga	agggattttg	agttgccagc	2220
tcctccaagg	ccagttaggc	cagttaccca	gatctgagtc	gacctgcagg	catgcccgtc	2280
gaaatcacca	gtctctctct	acaaatctat	ctctctctat	aataatgtgt	gagtagttcc	2340
cagataaggg	aattagggtt	cttatagggt	ttcgctcatg	tggtgagcat	ataagaaacc	2400
cttagtatgt	atlttgatltt	gtaaaatact	tctatcaata	aaatlttcta	ttcctaaaac	2460
caaaatccag	tggaagctta	ctcgaggtca	ttcatatgct	tgagaagaga	gtcgggatag	2520
tccaaaataa	aacaaaggta	agattacctg	gtcaaaagtg	aaaacatcag	ttaaaagggtg	2580
gtataaagta	aaatatcggt	aataaaaagg	ggcccaaagt	gaaatlttact	ctltttctact	2640
attataaaaa	ttgaggatgt	ttttgtcggt	actlttgatac	gtcattltttg	tatgaattgg	2700
tttttaagtt	tattcgctltt	tggaaatgca	tatctgtatt	tgagtcgggt	tttaagttcg	2760
tttgctltttg	taaatacaga	gggattltgt	taagaaatat	ctlttagaaa	acccatatgc	2820
taatttgaca	taattltttga	gaaaaatata	tatttcaggcg	aattctcaca	atgaacaata	2880
ataagattaa	aatagctltt	ccccgttgca	gcgcattgggt	atlttttcta	gtaaaaataa	2940
aagataaaat	tagactcaaa	acattlttcaa	aaacaaaccc	taaagttcct	aaagcccaaa	3000
gtgctatcca	cgatccatag	caagcccagc	ccaacccaac	ccaacccaac	ccaccccagt	3060
ccagccaact	ggacaatagt	ctccacaccc	ccccactatc	accgtgagtt	gtccgcacgc	3120
accgcacgtc	tcgcagccaa	aaaaaaaaag	aaagaaaaaa	aagaaaaaga	aaaaacagca	3180
ggtgggtccg	ggtcgtgggg	gccggaaacg	cgaggaggat	cgcgagccag	cgacgaggcc	3240
ggccctccct	ccgcttccaa	agaaaagccc	cccatcgcca	ctatatacat	acccccccct	3300
ctcctcccat	ccccccaacc	ctaccaccac	caccaccacc	acctccacct	cctccccct	3360

cgctgccgga	cgacgagctc	ctccccctc	cccctccgcc	gccgccgcgc	cggtaacccac	3420
cccgcctctc	tcctcctttc	ttctccgttt	ttttttccgt	ctcggctctc	atctttggcc	3480
ttggtagttt	gggtgggoga	gaggcggtt	cgtgcgcgcc	cagatcggtg	cgcgggagg	3540
gcgggatctc	gcggctgggg	ctctcgccgg	cgtggatccg	gcccggtatc	cgcggggaat	3600
ggggctctcg	gatgtagatc	tgcgatccgc	cgttggtggg	ggagatgatg	gggggtttaa	3660
aatttccgcc	gtgctaaaca	agatcaggaa	gaggggaaaa	gggcactatg	gtttatat	3720
ttatatattt	ctgctgcttc	gtcaggctta	gatgtgctag	atctttcttt	cttctttttg	3780
tgggtagaat	ttgaatccct	cagcattggt	catcggtagt	ttttcttttc	atgatttgtg	3840
acaaatgcag	cctcgtgcgg	agcttttttg	taggtagaag	tgatcaacca	tggcgcaagt	3900
tagcagaatc	tgcaatggtg	tgcagaacct	atctcttatc	tccaatctct	cgaaatccag	3960
tcaacgcaaa	tctcccttat	cgttttctct	gaagacgcag	cagcatccac	gagcttatcc	4020
gatttcgtcg	tcgtggggat	tgaagaagag	tgggatgacg	ttaattggct	ctgagcttcg	4080
tcctcttaag	gtcatgtctt	ctgtttccac	ggcgtgcatg	cttcacgggtg	caagcagccg	4140
gcccgcaacc	gcccgcgaat	cctctggcct	ttccggaacc	gtccgcattc	ccggcgacaa	4200
gtcgatctcc	caccggtcct	tcatgttcgg	cggctctcgg	agcggtgaaa	cgcgcatcac	4260
cggccttctg	gaaggcgagg	acgtcatcaa	tacgggcaag	gccatgcagg	cgatgggcgc	4320
ccgcatacgt	aaggaaggcg	acacctggat	catcgatggc	gtcggcaatg	gcggcctcct	4380
gggccttgag	gcggcgctcg	atttcggcaa	tgccgccacg	ggctgccgcc	tgacgatggg	4440
cctcgctcgg	gtctacgatt	tcgacagcac	cttcacgggc	gacgcctcgc	tcacaaagcg	4500
cccgatgggc	cgctgttga	acccgctgcg	cgaaatgggc	gtgcagggtga	aatcggaaga	4560
cggtgaccgt	cttcccgtta	ccttgccgcg	gccgaagacg	ccgacgccga	tcacctaccg	4620
cgtgccgatg	gcctccgcac	aggtgaagtc	cgccgtgctg	ctcgccggcc	tcaacacgcc	4680
cggcatacac	acggtcatcg	agccgatcat	gacgcgcgat	catacgaaa	agatgctgca	740
gggctttggc	gccaacctta	ccgtcgagac	ggatgcggac	ggcgtgcgca	ccatccgcct	4800
ggaaggccgc	ggcaagctca	ccggccaagt	catcgacgtg	ccgggcgacc	cgctcctcgac	4860
ggccttcccg	ctggttgccg	ccctgcttgt	tcggggctcc	gacgtcacca	tcctcaacgt	4920
gctgatgaac	ccacccgcga	ccggcctcat	cctgacgctg	caggaaatgg	gcgccgacat	4980
cgaagtcata	aaccgcgcgc	ttgccggcgg	cgaagacgtg	gcggacctgc	gcgttcgctc	5040
ctccacgctg	aagggcgtca	cggtgccgga	agaccgcgcg	ccttcgatga	tcgacgaata	5100
tcggattctc	gctgtcgccg	ccgccttcgc	ggaaggggcg	accgtgatga	acggctctga	5160
agaactccgc	gtcaaggaaa	gcgaccgcct	ctcgcccgctc	gccaatggcc	tcaagctcaa	5220
tggcgtggat	tgcatgagg	gcgagacgtc	gctcgctcgt	cgtggccgcc	ctgacggcaa	5280
ggggctcggc	aacgcctcgg	gcgcgcgcgt	gccaccccat	ctcgatcacc	gcatcgccat	5340
gagcttcctc	gtcatgggcc	tcgtgtcggg	aaaccctgtc	acggtggacg	atgccacgat	5400
gatcgccacg	agcttcccgg	agttcatgga	cctgatggcc	gggctgggcg	cgaagatcga	5460
actctccgat	acgaaggctg	cctgaactag	tgatcgttca	aacatttggc	aataaagt	5520
cttaagattg	aatcctgttg	ccggtcttgc	gatgattatc	atataatttc	tggtgaatta	5580
cgtaagcat	gtaataatta	acatgtaatg	catgacgtta	tttatgagat	gggtttttat	5640
gattagagtc	ccgcaattat	acatttaata	cgcatagaaa	aacaaaatat	agcgcgcaaa	5700
ctaggataaa	ttatcgcgcg	cgggtgtcatc	tatgttacta	gatcggatcc	cgtggtcccg	5760
gtcccgttta	aacctaatac	gtcagtgccg	gtgagagcgt	agctgcctgg	aagcggcctc	5820
gtcagccagt	tgagagcagt	gaagaggggc	ttcagatcca	gggcgcgcaa	ggcccaaaaca	5880
accagcccac	cagccttact	cgagaatcag	cgctcactca	ctcgtcccag	cggtcgtgac	5940
gtaggcgtag	ctccattaaa	acatgcatgg	tgatgctaag	caagaaataa	atttcatttt	6000
attaaaaaaa	tgtataaatt	ttgtcgggtt	agctgagccc	gacaaagtaa	agactcctag	6060
cttgcccggtg	tatgctttgt	tgtttccctt	gaactcgatc	gatgacaatc	catggaccat	6120
gcagcttgct	ctggtccttt	cccttgctct	ggtgcacoga	ggtgcccccc	cccccccccg	6180
gtaaccacag	aaggattgta	ttgtacgttc	ccatcgtgaa	ggacgggttg	aggataggaa	6240
aaggagacga	gtaggttcaa	gaatctagag	agcgtaacgt	tctgctccat	tgcccatcga	6300
cattcaccaa	accgaagcat	caagccatca	accatctcta	atggtccatc	catccatcca	6360
tgcgatatatt	tttgaagaag	gccgtccata	tgccgggtgg	ggtacgttta	gocattaaac	6420
tgtccgtgtg	gcctccctca	atcatcttcc	ttctcttctc	ctgacaggac	acatcatgtg	6480
gactgcatgt	aggccagccc	aggaatcatg	gcacgaaacg	catgattcgt	tgcgcgctcag	6540
gccaccgcgc	gacatacgaa	ggcgccccca	cattctgggtg	ccggctcatt	gcctcgocctc	6600
aagatggcaa	aggaccacga	ggaacgattg	catggatctg	tcccactaag	gtggtgttta	6660

```

gtatgaagaa tcaatccatt ataaataagg tagtgcattct tcagttcatt ccataaagtt 6720
ggtgaaatga actcattcct catgttatta ctattattag cttatgagga ataaaatggt 6780
gatagatcag ctcatcccat ttcacgaacc aaacaagaaa gtgaagaata agaagatcat 6840
agtttacctc attttotcaaa ccaaatactc cataaaattt ccgtcctgaa 6890

```

<210> 6

<211> 234

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nằm bên trong SEQ ID NO: 3 mà nó bắc qua trình tự ADN của cấu trúc DBN10006 và trình tự gen khởi điểm pr35S

<400> 6

```

ggatatattg tgggtgaaac aaattgacgc ttagacaact taataacaca ttgcggatac 60
ggccatgctg gccgcccata taaggcgcgc catggagtca aagattcaaa tagaggacct 120
aacagaactc gccgtaaaga ctggcgaaca gttcatacag agtctcttac gactcaatga 180
caagaagaaa atcttcgtca acatgggtgga gcacgacacg cttgtctact ccaa 234

```

<210> 7

<211> 248

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nằm bên trong SEQ ID NO: 4 mà nó bắc qua trình tự gen kết thúc tNos và trình tự ADN của cấu trúc DBN10006

<400> 7

```

cgттааgсat gтаатаатта асатgтаатg сатgасgtта ttтatgagat gggтttttat 60
gattagagtc ссgсaattat асattтаата сgсgатagaa аасaaаатат агсgсgсaaа 120
сtaggатаaa ttатсgсgсg сggтgtсatс tatgttacta gatсggatсс сgtggтсссg 180
gtсссgttta аacстаатсa gтсagтgссg gтgagagсgt агтггсctгg аagсggсctс 240
gtсagссa 248

```

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi thứ nhất để khuếch đại SEQ ID NO: 3

<400> 8

```

atgccctgcc tgactcactg aag 23

```

<210> 9

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi thứ hai để khuếch đại SEQ ID NO: 3

<400> 9
 ttggagtaga caagcgtgtc gtgct 25

<210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi thứ nhất để khuếch đại SEQ ID NO: 4

<400> 10
 cgттаagcat gтаатаатта асатgтаатg 30

<210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi thứ hai để khuếch đại SEQ ID NO: 4

<400> 11
 ttсaggacgg aaatttttatg gagta 25

<210> 12
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi trên trình tự hệ gen chặn đầu 5'

<400> 12
 gcaggcagtt agctctgaat aacacg 26

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ghép cặp với SEQ ID NO: 12

<400> 13
 acggcgagtt ctgttaggtc c 21

<210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi trên trình tự hệ gen chặn đầu 3'

<400> 14
 agcatacacg gccaaagctag gagt 24

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ghép cặp với SEQ ID NO: 14

<400> 15
 gctgcctgga agcggcctcg 20

<210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi 1 để phát hiện EPSPS bằng Taqman

<400> 16
 ctggaaggcg aggacgtcat caata 25

<210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi 2 để phát hiện EPSPS bằng Taqman

<400> 17
 tggcggcatt gccgaaatcg ag 22

<210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò 1 để phát hiện EPSPS bằng Taqman

<400> 18
 atgcaggcga tgggcgcccg catccgta 28

<210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi 3 để phát hiện PAT bằng Taqman

<400> 19		
cagttgagat taggccagct acag		24
<210> 20		
<211> 27		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Đoạn mỗi 4 để phát hiện PAT bằng Taqman		
<400> 20		
ttcactgtag acgtctcaat gtaatgg		27
<210> 21		
<211> 24		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Đoạn dò 2 để phát hiện PAT bằng Taqman		
<400> 21		
cagctgatat ggccgcggtt tgtg		24
<210> 22		
<211> 23		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Đoạn mỗi thứ nhất cho gen nội sinh ở ngô Ubiquitin		
<400> 22		
agcagacggc acggcatctc tgt		23
<210> 23		
<211> 27		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Đoạn mỗi thứ hai cho gen nội sinh ở ngô Ubiquitin		
<400> 23		
cagaagtaga actaccgggc cctaacc		27
<210> 24		
<211> 310		
<212> ADN		
<213> Trình tự nhân tạo		
<220>		
<223> Đoạn dò cho PAT trong phát hiện lai thẩm tích Southern		

<400> 24
 cagacttaaa accttgcgcc tccatagact taagcaaatg tgtgtacaat gtggatccta 60
 ggcccaacct ttgatgccta tgtgacacgt aaacagtact ctcaactgtc caatcgtaag 120
 cgttcctagc cttccagggc ccagcgtaag caataccagc cacaacaccc tcaacctcag 180
 caaccaacca agggatatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtgggtg 240
 tttgtggctc tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggta acgatatcac 300
 aaaccgcgcc 310

<210> 25
 <211> 304
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn dò cho EPSPS trong phát hiện lai thăm tích Southern

<400> 25
 ggtcaccgtc ttccgatttc acctgcacgc ccatttcgcg cagcggggtc aacacgcggc 60
 ccatcgggcg ctttgtgagc gaggcgtcgc cgatgaaggt gctgtcgaaa tcgtagaccc 120
 cgacgaggcc catcgtcagg cggcagcccg tggcggcatt gccgaaatcg agcggcgcct 180
 caggcgccag gaggccgcca ttgccgacgc catcgatgat ccaggtgtcg ccttccttac 240
 ggatgcgggc gcccatcgcc tgcattggcct tgcccgtatt gatgacgtcc tcgccttcca 300
 gaag 304

<210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó cùng chiều với SEQ ID NO: 13

<400> 26
 aagcgtgtcg tgctccacc 19

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó theo chiều ngược lại với SEQ ID NO: 13

<400> 27
 ccacccacga ggagcatcgt 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó theo chiều ngược lại với SEQ ID NO: 13

<400> 28

tgacgtaagg gatgacgcac

20

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó cùng chiều với SEQ ID NO: 15

<400> 29

acctaatacag tcagtgccgg

20

<210> 30

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó theo chiều ngược lại với SEQ ID NO: 15

<400> 30

gcgggactct aatcataaaa accc

24

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN mà nó theo chiều ngược lại với SEQ ID NO: 15

<400> 31

cgcaagaccg gcaacaggat

20