



(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)



1-0031196

(51)⁷ C07K 14/325; C12N 15/82; C12N
15/75; A01N 63/02

(13) B

(21) 1-2018-00221

(22) 30/06/2016

(86) PCT/US2016/040382 30/06/2016

(87) WO 2017/007679 12/01/2017

(30) 62/189,573 07/07/2015 US

(45) 25/02/2022 407

(43) 25/06/2018 363A

(73) SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (CH)

Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Switzerland

(72) BRAMLETT, Matthew Richard (US); SEGUIN, Katherine (US); KRAMER, Vance
Cary (US); ROSE, Mark Scott (US).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) GEN KHẢM CÓ CHỨA VÙNG KHỞI ĐỘNG KHÁC LOẠI, PROTEIN CRY ĐƯỢC MÃ HÓA BỞI GEN KHẢM, CHẾ PHẨM DIỆT CÔN TRÙNG CÓ CHỨA PROTEIN CRY NÀY, CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT LOÀI GÂY HẠI LÀ SÂU BỌ CẢNH VÂY

(57) Sáng chế đề cập đến gen khảm có chứa vùng khởi động khác loại, protein Cry được mã hóa bởi gen khảm, chế phẩm diệt côn trùng có chứa protein Cry này. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến cây trồng chuyển gen, phương pháp tạo ra cây trồng chuyển gen và phương pháp kiểm soát loài gây hại là sâu bọ cánh vảy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến gen khảm có chứa vùng khởi động khác loại, protein Cry được mã hóa bởi gen khảm, chế phẩm diệt côn trùng có chứa protein Cry này. Ngoài ra sáng chế còn đề cập đến cây trồng chuyển gen, phương pháp tạo ra cây trồng chuyển gen và phương pháp kiểm soát loài gây hại là sâu bọ cánh vảy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bacillus thuringiensis (Bt) là vi khuẩn đất tạo bào tử gram dương đặc trưng bởi khả năng tạo ra thể vùi tinh thể mà gây độc đặc hiệu đối với các bộ và các loài nhất định của các loài gây hại thực vật, bao gồm côn trùng, nhưng vô hại đối với thực vật và các sinh vật không phải là đích khác. Vì lý do này, chế phẩm chứa chủng *Bacillus thuringiensis* hoặc protein diệt côn trùng của chúng có thể được dùng làm chất diệt côn trùng chấp nhận được cho môi trường để kiểm soát các loài côn trùng gây hại nông nghiệp hoặc vật truyền côn trùng của nhiều bệnh ở người hoặc động vật khác nhau.

Protein tinh thể (Cry) từ *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính diệt côn trùng hiệu nghiệm chống lại chủ yếu là côn trùng gây hại là sâu bọ cánh vảy, sâu bọ hai cánh, và bộ cánh cứng. Các protein này cũng thể hiện hoạt tính chống lại loài gây hại thuộc các Bộ Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Mallophaga, và Acari, cũng như là các bộ không xương sống khác chẳng hạn như Nematelminthes, Platyhelminthes, và Sarcomastigophora (Feitelson, J. 1993. The *Bacillus Thuringiensis* family tree. In Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Các protein này ban đầu được phân loại là từ CryI đến CryVI chủ yếu dựa trên hoạt tính diệt côn trùng của chúng. Các lớp chính là đặc hiệu Bộ Cánh vảy (I), đặc hiệu Bộ Cánh vảy và Bộ Hai cánh (II), đặc hiệu Bộ Cánh cứng (III), đặc hiệu Bộ Hai Cánh (IV), và đặc hiệu giun tròn (V) và (VI). Các protein còn được phân loại thành các phân họ; các protein liên quan cao hơn trong mỗi họ được đặt các chữ cái phân chia như CryIA, CryIB, CryIC, v.v.. Các protein liên quan gần hơn nữa trong mỗi nhóm được đặt tên như

CryIC(a), CryIC(b), v.v.. Các thuật ngữ “độc tố Cry” và “nội độc tố delta” được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ “protein Cry.” Danh pháp hiện nay đối với protein và gen Cry dựa trên độ tương đồng trình tự axit amin chứ không phải là độ đặc hiệu đích côn trùng (Crickmore *et al.* (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813). Theo phân loại được chấp nhận hơn này, mỗi độc tố được đặt tên duy nhất kết hợp với hàng chính (chữ số Ả rập), hàng thứ hai (ký tự viết hoa), hàng thứ ba (ký tự viết thường), và hàng thứ tư (chữ số Ả rập khác). Theo phân loại hiện nay, các chữ số La Mã được đổi cho các chữ số Ả rập ở hàng thứ nhất. Ví dụ, “CryIA(a)” theo danh pháp cũ nay là “Cry1Aa” theo danh pháp hiện nay. Theo Ibrahim *et al.* (2010, Bioeng. Bugs, 1:31-50), độc tố Cry có thể vẫn được chia thành sáu lớp chính theo độ đặc hiệu vật chủ côn trùng của chúng và bao gồm: Nhóm 1—sâu bọ cánh vảy ví dụ như, Cry1, Cry9 và Cry15); Nhóm 2—sâu bọ cánh vảy và sâu bọ hai cánh (ví dụ như, Cry2); Nhóm 3—bọ cánh cứng (Cry3, Cry7 và Cry8); Nhóm 4—sâu bọ hai cánh (Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 và Cry20); Nhóm 5—sâu bọ cánh vảy và bọ cánh cứng (Cry11); và Nhóm 6—giun tròn (Cry6). Các độc tố Cry1I, Cry2, Cry3, Cry10 và Cry11 (73–82 kDa) là duy nhất bởi vì chúng dường như là dạng cắt tự nhiên của các protein Cry1 và Cry4 lớn hơn (130–140 kDa).

Protein Cry là phân tử protein hình cầu mà tích lũy dưới dạng tiền độc tố ở dạng kết tinh trong giai đoạn hình thành bào tử của *Bt*. Sau khi bị loài gây hại ăn, các tinh thể này thường được hòa tan để giải phóng tiền độc tố, mà có kích thước nằm trong khoảng, ví dụ, từ 130-140 kDa đối với nhiều protein Cry có hoạt tính đối với sâu bọ cánh vảy, chẳng hạn như Cry1 và Cry9, và 60-80 kDa đối với protein Cry3 có hoạt tính đối với bọ cánh cứng và protein Cry2 có hoạt tính đối với sâu bọ cánh vảy/sâu bọ hai cánh. Sau khi các tinh thể này được hòa tan bởi côn trùng nhạy cảm tiền độc tố đã được giải phóng được xử lý bằng proteaza trong ruột côn trùng, ví dụ trypsin và chymotrypsin, để tạo ra độc tố protein Cry lõi kháng proteaza. Sự xử lý phân giải protein này gồm có sự loại bỏ axit amin từ các vùng khác nhau của các tiền độc tố Cry khác nhau. Ví dụ, tiền độc tố Cry nặng 130-140 kDa thường được hoạt hóa thông qua sự loại bỏ bằng cách phân giải protein của peptit đầu tận cùng N có 25-30 axit amin và xấp xỉ một nửa protein còn lại từ đầu tận cùng C tạo ra độc tố Cry trưởng thành nặng xấp xỉ 60-70 kDa. Tiền độc tố nặng 60-80 kDa, ví dụ như Cry2 và Cry3, cũng được xử lý nhưng không đến cùng mức độ như tiền độc tố lớn hơn. Tiền độc tố nhỏ hơn thường

có số lượng axit amin được loại bỏ từ đầu tận cùng N bằng hoặc lớn hơn so với tiền độc tố lớn hơn nhưng có số lượng axit amin được loại bỏ từ đầu tận cùng C ít hơn. Ví dụ, sự hoạt hóa bằng cách phân giải protein của các thành viên họ Cry2 thường gồm có sự loại bỏ xấp xỉ 40-50 axit amin ở đầu tận cùng N. Nhiều protein Cry khá độc đối với côn trùng đích đặc hiệu, nhưng nhiều protein Cry có phổ hoạt tính hẹp.

Protein Cry thường có năm miền trình tự bảo toàn, và ba miền cấu trúc bảo toàn (xem, ví dụ, de Maagd *et al.* (2001) Trends Genetics 17:193-199). Miền cấu trúc bảo toàn thứ nhất, gọi là Miền I, thường gồm có bảy cấu trúc xoắn alpha và tham gia vào sự cài xen màng và tạo lỗ rỗng. Miền II thường gồm có ba tấm beta được bố trí trong cấu hình chìa khóa Greek, và Miền III thường gồm có hai tấm beta đối song trong cấu tạo 'cuộn lỏng' (de Maagd *et al.*, 2001, ở trên). Các miền II và III tham gia vào sự nhận diện thụ thể và liên kết, và do đó được coi là các phần quyết định tính đặc hiệu độc tố.

Nhiều cây trồng có giá trị thương mại, bao gồm các cây nông nghiệp thông thường, nhạy cảm đối với sự tấn công bởi các loài gây hại cây trồng bao gồm các côn trùng và giun tròn gây hại, gây giảm đáng kể sản lượng và chất lượng cây trồng. Ví dụ, loài gây hại cây trồng là yếu tố chính trong sự thiệt hại về cây nông nghiệp quan trọng của thế giới. Thiệt hại khoảng 8 tỷ đô la Mỹ mỗi năm chỉ riêng ở Mỹ do sự phá hoại của loài gây hại không xương sống bao gồm côn trùng. Côn trùng gây hại cũng là gánh nặng đối với người trồng rau và cây ăn quả, đối với những người sản xuất hoa trang trí, và đối với người làm vườn tại nhà.

Các loài gây hại côn trùng chủ yếu được kiểm soát nhờ áp dụng chuyên sâu các chất diệt loài gây hại hoá học, có hoạt tính thông qua việc ức chế sự tăng trưởng của côn trùng, ngăn ngừa sự lớn lên hoặc sinh sôi nảy nở của côn trùng, hoặc gây chết. Các tác nhân kiểm soát loài gây hại sinh học, như chủng *Bacillus thuringiensis* biểu hiện độc tố diệt loài gây hại như protein Cry, cũng được áp dụng lên cây trồng với hiệu quả tốt, tạo ra sự thay thế hoặc phần thưởng cho thuốc diệt loài gây hại hóa học. Các gen mã hóa đối với một số trong các protein Cry này đã được phân lập và biểu hiện của chúng ở vật chủ khác loại như cây trồng chuyển gen thể hiện là tạo ra công cụ khác để kiểm soát các loài côn trùng gây hại quan trọng về kinh tế.

Do đó, có thể đạt được kiểm soát côn trùng tốt, nhưng một số chất hóa học nhất định đôi khi có thể còn ảnh hưởng đến côn trùng có ích không phải đích và một số chất sinh học nhất định có phổ hoạt tính rất hẹp. Ngoài ra, việc sử dụng tiếp một số phương pháp kiểm soát hóa học và sinh học nhất định làm tăng khả năng cho loài côn trùng gây hại phát triển khả năng kháng các phương pháp kiểm soát này. Điều này đã được làm giảm bớt một phần bởi các hoạt động quản lý tính kháng khác nhau, nhưng vẫn có nhu cầu phát triển tác nhân kiểm soát loài gây hại mới và hữu hiệu mà mang lại lợi ích kinh tế cho nông dân và chấp nhận được về mặt môi trường. Đặc biệt có nhu cầu là các tác nhân kiểm soát mà có thể nhắm đích vào phổ rộng hơn của các côn trùng gây hại quan trọng về mặt kinh tế và kiểm soát một cách hữu hiệu các chủng côn trùng mà kháng hoặc có thể trở nên kháng với các tác nhân kiểm soát côn trùng hiện có.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Xem xét đến các nhu cầu này, mục đích của sáng chế là đề xuất tác nhân kiểm soát loài gây hại mới bằng cách đề xuất thể phân lập *Bacillus thuringiensis* (Bt) mới cũng như là gen và protein diệt loài gây hại mới mà có thể được sử dụng để kiểm soát nhiều loài gây hại thực vật.

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp tạo ra hoạt tính diệt loài gây hại cho vi khuẩn, cây, tế bào, mô và hạt của cây. Cụ thể là, sáng chế đề xuất gen khảm có chứa polynucleotit mới mà mã hóa cho protein Cry được phân lập từ Bt và các trình tự về cơ bản giống chúng, mà sự biểu hiện của chúng tạo ra protein có độc tính đối với các loài côn trùng gây hại quan trọng về mặt kinh tế, cụ thể là côn trùng gây hại mà phá hoại cây trồng. Sáng chế còn đề cập đến protein Cry mới thu được từ sự biểu hiện của polynucleotit, và đề cập đến chế phẩm và chế phẩm bào chế có chứa protein Cry, mà gây độc đối với côn trùng bằng cách ức chế khả năng của côn trùng gây hại để sống sót, sinh trưởng và sinh sản, hoặc hạn chế sự tổn thất hoặc thiệt hại liên quan đến côn trùng đối với cây trồng. Protein Cry theo sáng chế bao gồm protein Cry tự nhiên và protein Cry đột biến hoặc biến thể mà có một hoặc nhiều sự thể, sự thêm hoặc sự bớt axit amin. Ví dụ về protein Cry đột biến bao gồm mà không giới hạn ở các protein Cry mà được gây đột biến để có phổ hoạt tính rộng hơn hoặc hoạt tính đặc hiệu cao hơn so với các đối tác protein Cry tự nhiên của chúng, các protein Cry này được gây đột biến để đưa vào epitop để tạo ra kháng thể mà nhận diện phân biệt protein đột biến từ protein tự nhiên hoặc protein Cry đột biến để điều biến sự biểu hiện ở sinh vật

chuyển gen. Protein Cry mới theo sáng chế có độ độc cao đối với côn trùng gây hại. Ví dụ, protein Cry theo sáng chế có thể được sử dụng để kiểm soát một hoặc nhiều côn trùng gây hại quan trọng về mặt kinh tế chẳng hạn như sâu ngài đêm màu đen (*Agrotisipsilon*), sâu đục thân ngô châu Âu (*Ostriniamubilalis*), sâu xanh mùa thu (*Spodopterafrugiperda*), sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpazea*), sâu đục thân mía (*Diatraeasaccharalis*), sâu bướm đậu nhung (*Anticarsia gemmatalis*), sâu đo hại đậu tương (*Chrysodeixisincludes*), sâu đục thân ngô tây nam (*Diatraeagrandsella*), sâu ngài đêm hại đậu phương tây (*Richiaalbicosta*), sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothisvirescens*), sâu đục thân ngô châu Á (*Ostriniafurnacalis*), sâu đục quả bông (*Helicoverpaarmigera*), sâu đục thân có sọc (*Chilosuppressalis*), sâu đục thân màu hồng (*Sesamia calamistis*), sâu cuốn lá lúa (*Cnaphalocrocismedinalis*), và côn trùng tương tự.

Sáng chế cũng đề xuất polynucleotit tổng hợp mà mã hóa cho protein Cry theo sáng chế mà có một hoặc nhiều được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở sinh vật chuyển gen chẳng hạn như vi khuẩn chuyển gen hoặc cây trồng chuyển gen.

Sáng chế còn đề xuất băng catxet biểu hiện và vector tái tổ hợp chứa polynucleotit mà mã hóa protein Cry theo sáng chế. Sáng chế cũng đề xuất vi khuẩn, cây trồng, tế bào, mô, và hạt cây trồng được biến nạp có chứa gen khảm, hoặc băng catxet biểu hiện hoặc vector tái tổ hợp mà hữu dụng trong việc biểu hiện protein Cry theo sáng chế trong vi khuẩn, cây trồng, tế bào, mô và hạt cây trồng được biến nạp.

Sáng chế còn đề cập đến chủng *Bacillusthuringiensis* (Bt) được phân lập mà sản xuất protein Cry theo sáng chế. Chủng Bt này có thể là thể phân lập có trong tự nhiên hoặc chủng Bt tái tổ hợp mà sản xuất một hoặc nhiều protein Cry theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sử dụng polynucleotit theo sáng chế, ví dụ trong cấu trúc ADN hoặc gen khảm hoặc băng catxet biểu hiện hoặc vector tái tổ hợp để biến nạp và biểu hiện ở sinh vật, bao gồm thực vật và vi sinh vật, chẳng hạn như vi khuẩn. Trình tự nucleotit hoặc axit amin có thể là trình tự tự nhiên hoặc tổng hợp mà đã được thiết kế để biểu hiện ở sinh vật chẳng hạn như thực vật hoặc vi khuẩn hoặc để tạo ra độc tố Cry lai có hoạt tính diệt loài gây hại được tăng cường. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra protein Cry và phương pháp sử dụng các trình tự

polynucleotit và protein Cry, ví dụ trong vi sinh vật để kiểm soát côn trùng hoặc trong cây trồng chuyển gen để mang lại sự bảo vệ khỏi sự gây hại của côn trùng.

Khía cạnh khác của sáng chế bao gồm chế phẩm diệt côn trùng và chế phẩm có chứa protein Cry hoặc chủng *Bacillus thuringiensis* theo sáng chế, và phương pháp sử dụng chế phẩm hoặc chế phẩm bào chế này để kiểm soát quần thể côn trùng, ví dụ bằng cách áp dụng chế phẩm hoặc chế phẩm bào chế này cho khu vực bị phá hoại bởi côn trùng, hoặc để xử lý phòng ngừa cho diện tích dễ bị tấn công bởi côn trùng hoặc cây trồng để mang lại sự bảo vệ chống lại côn trùng gây hại. Tùy chọn chế phẩm hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể, ngoài protein Cry hoặc chủng *Bt* theo sáng chế, có chứa tác nhân diệt loài gây hại khác chẳng hạn như chất diệt loài gây hại hóa học để gia tăng hoặc tăng cường khả năng kiểm soát côn trùng của chế phẩm hoặc chế phẩm.

Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế hữu dụng để kiểm soát côn trùng gây hại mà tấn công thực vật, cụ thể là cây trồng. Chế phẩm theo sáng chế cũng hữu dụng để tạo ra protein Cry được thay đổi hoặc được cải thiện mà có hoạt tính diệt loài gây hại, hoặc để phát hiện sự có mặt của protein Cry hoặc axit nucleic trong sản phẩm thương mại hoặc sinh vật chuyển gen.

Các dấu hiệu, khía cạnh, và lợi ích này và khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi viện dẫn đến phân mô tả chi tiết và các yêu cầu bảo hộ sau đây.

Mô tả vắn tắt các trình tự trong danh mục trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự nucleotit mã hóa cho protein BT-0016.

SEQ ID NO:2 là trình tự nucleotit mã hóa cho protein BT-0026.

SEQ ID NO:3 là trình tự nucleotit mã hóa cho protein BT-0032.

SEQ ID NO:4 là trình tự được tối ưu hóa bộ ba mã hóa mã hóa cho protein BT-0016.

SEQ ID NO:5 là trình tự được tối ưu hóa bộ ba mã hóa mã hóa cho protein BT-0026.

SEQ ID NO:6 là trình tự được tối ưu hóa bộ ba mã hóa mã hóa cho protein BT-0032.

SEQ ID NO:7 là trình tự nucleotit mã hóa cho protein BT-0016 đột biến.

SEQ ID NO:8 là trình tự nucleotit mã hóa cho protein BT-0026 đột biến.

SEQ ID NO:9 là trình tự nucleotit mã hóa cho protein BT-0032 đột biến.

SEQ ID NO:10 là trình tự axit amin của protein BT-0016.

SEQ ID NO:11 là trình tự axit amin của protein BT-0026.

SEQ ID NO:12 là trình tự axit amin của protein BT-0032.

SEQ ID NO:13 là trình tự axit amin của protein BT-0016 đột biến.

SEQ ID NO:14 là trình tự axit amin của protein BT-0026 đột biến.

SEQ ID NO:15 là trình tự axit amin của protein BT-0032 đột biến.

Các SEQ ID NO:16-17 là các trình tự đoạn môi hữu dụng trong sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả này không nhằm làm danh mục chi tiết của tất cả các cách khác nhau để có thể thực hiện sáng chế, hoặc tất cả các dấu hiệu có thể được thêm vào sáng chế này. Ví dụ, các dấu hiệu được minh họa theo một phương án có thể được kết hợp với các phương án khác, và các dấu hiệu được minh họa theo phương án cụ thể có thể được xóa bỏ khỏi phương án này. Do đó, sáng chế dự tính rằng theo một số phương án của sáng chế, dấu hiệu bất kỳ hoặc dạng kết hợp các dấu hiệu được đề cập ở đây có thể được loại bỏ hoặc bỏ qua. Ngoài ra, nhiều biến thể và bổ sung cho các phương án khác nhau được khuyến khích ở đây sẽ được thực hiện bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực theo sáng chế, mà không vượt ra khỏi phạm vi sáng chế. Vì vậy, phần mô tả sau đây nhằm minh họa một số phương án cụ thể của sáng chế, và không xác định tường tận tất cả các sắp xếp, dạng kết hợp và biến thể của chúng.

Trừ khi có chỉ định khác, toàn bộ các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có cùng nghĩa như cách hiểu thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Thuật ngữ được sử dụng trong phần mô tả của sáng chế ở đây chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể và không nhằm làm giới hạn sáng chế.

Định nghĩa

Như được sử dụng ở đây và ở yêu cầu bảo hộ kèm theo, các mạo từ số ít bao gồm việc đề cập đến số nhiều trừ khi ngữ cảnh rõ ràng chỉ ra nghĩa khác. Do đó, ví dụ,

viện dẫn đến "cây trồng" là viện dẫn đến một hoặc nhiều cây trồng và bao gồm các dạng tương đương của chúng đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, và v.v.. Như được sử dụng ở đây, từ "hoặc" nghĩa là một thành phần bất kỳ của danh sách cụ thể và còn bao gồm dạng kết hợp bất kỳ của các thành phần của danh sách đó (tức là, còn bao gồm "và").

Thuật ngữ "khoảng" được sử dụng ở đây nghĩa là xấp xỉ, gần, xung quanh, hoặc trong khoảng. Khi thuật ngữ "khoảng" được dùng kết hợp với khoảng số, nó thay đổi khoảng này bằng cách mở rộng giới hạn trên và dưới của giá trị bằng số được cho. Thông thường, thuật ngữ "khoảng" được sử dụng ở đây để thay đổi giá trị bằng số ở trên và dưới giá trị được cho với phương sai bằng 20 phần trăm, tốt hơn là 10 phần trăm lên hoặc xuống (cao hơn hoặc thấp hơn). Đối với thuật ngữ nhiệt độ "khoảng" nghĩa là $\pm 1^{\circ}\text{C}$, tốt hơn là $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Khi thuật ngữ "khoảng" được dùng trong ngữ cảnh của sáng chế (ví dụ, kết hợp với các giá trị nhiệt độ hoặc khối lượng phân tử) giá trị chính xác (tức là, không có "khoảng") được ưu tiên.

Thuật ngữ "hoạt tính" của protein Cry độc theo sáng chế nghĩa là các chức năng protein độc làm tác nhân kiểm soát côn trùng hoạt tính qua đường miệng, có hiệu quả gây độc, hoặc có khả năng làm gián đoạn hoặc ngăn cản sự phá hoại của côn trùng, mà có thể hoặc không thể dẫn đến gây chết côn trùng. Khi protein gây độc theo sáng chế được phân phối lên côn trùng, kết quả thường là gây chết côn trùng, hoặc côn trùng không gây hại đối với nguồn mà tạo ra protein độc cho côn trùng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khuếch đại" nghĩa là việc xây dựng nhiều bản sao của phân tử axit nucleic hoặc nhiều bản sao bổ sung cho phân tử axit nucleic bằng cách sử dụng ít nhất một trong số các phân tử axit nucleic làm khuôn. Hệ thống khuếch đại bao gồm hệ phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), hệ phản ứng chuỗi ligaza (LCR), khuếch đại trên cơ sở trình tự axit nucleic (NASBA, Cingene, Mississauga, Ontario), hệ lặp Q-Beta Replicaza, hệ khuếch đại trên cơ sở phiên mã (TAS), và khuếch đại xáo trộn sợi (SDA). Xem tài liệu, ví dụ, Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, PERSING et al., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1993). Sản phẩm khuếch đại được gọi là "amplicon."

Thuật ngữ "cấu trúc khảm" hoặc "gen khảm" hoặc "polynucleotit khảm" hoặc "axit nucleic khảm" (hoặc thuật ngữ tương tự) như được sử dụng ở đây dùng để chỉ cấu trúc hoặc phân tử bao gồm hai hoặc nhiều polynucleotit có nguồn gốc khác nhau được ghép thành phân tử axit nucleic đơn lẻ. Thuật ngữ "cấu trúc khảm", "gen khảm", "polynucleotit khảm" hoặc "axit nucleic khảm" đề cập đến bất kỳ cấu trúc hoặc phân tử mà bao gồm, không giới hạn, (1) polynucleotit (ví dụ, ADN), chứa polynucleotit điều hòa và mã hóa mà không thấy cùng nhau trong tự nhiên (tức là, ít nhất một trong số các polynucleotit trong cấu trúc là khác loại với ít nhất một trong số các polynucleotit khác của nó), hoặc (2) các phần mã hóa polynucleotit của protein không tiếp giáp trong tự nhiên, hoặc (3) các phần của vùng khởi động mà không tiếp giáp trong tự nhiên. Hơn nữa, cấu trúc khảm, gen khảm, polynucleotit khảm hoặc axit nucleic khảm có thể chứa polynucleotit điều hòa và polynucleotit mã hóa mà có nguồn gốc từ các nguồn khác nhau, hoặc chứa polynucleotit điều hòa và polynucleotit mã hóa có nguồn gốc từ nguồn giống nhau, nhưng được sắp xếp theo cách khác với cách tìm thấy trong tự nhiên. Theo một số phương án của sáng chế, cấu trúc khảm, gen khảm, polynucleotit khảm hoặc axit nucleic khảm bao gồm băng catxet biểu hiện chứa polynucleotit theo sáng chế dưới sự kiểm soát của polynucleotit điều hòa, cụ thể là dưới sự kiểm soát của polynucleotit điều hòa chức năng trong cây trồng hoặc vi khuẩn.

"Trình tự mã hóa" là trình tự axit nucleic mà được phiên mã thành ARN như mARN, rARN, tARN, snARN, ARN có nghĩa hoặc ARN đối nghĩa. Tốt hơn là sau đó ARN được dịch mã trong sinh vật để tạo ra protein.

Như được sử dụng ở đây, trình tự "được tối ưu hóa bộ ba mã hóa" nghĩa là trình tự nucleotit của polynucleotit tái tổ hợp, chuyển gen, hoặc tổng hợp trong đó bộ ba mã hóa được chọn để phản ánh độ lệch bộ ba mã hóa cụ thể mà tế bào chủ hoặc sinh vật có thể có. Điều này thường được thực hiện theo cách này để bảo quản trình tự axit amin của polypeptit được mã hóa bởi trình tự nucleotit được tối ưu hóa bộ ba mã hóa. Theo một số phương án nhất định, trình tự ADN của cấu trúc ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự mà đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa cho tế bào (ví dụ, tế bào động vật, thực vật, hoặc nấm) trong đó cấu trúc này là để được biểu hiện. Ví dụ, cấu trúc được biểu hiện trong tế bào của cây trồng có thể có tất cả hoặc các phần của trình tự của nó (ví dụ, yếu tố khởi đầu gen thứ nhất hoặc yếu tố biểu hiện gen) được tối ưu hóa bộ ba

mã hóa để biểu hiện ở cây trồng. Xem, ví dụ, Bằng Sáng Chế Mỹ Số 6,121,014, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn.

"Kiểm soát" côn trùng có nghĩa là ức chế, thông qua tác dụng gây độc, khả năng của côn trùng gây hại để sống sót, sinh trưởng, ăn, hoặc sinh sản, hoặc hạn chế sự tồn thất hoặc thiệt hại do côn trùng ở cây trồng hoặc bảo vệ tiềm năng sản lượng của cây trồng khi sinh trưởng trong sự có mặt của côn trùng gây hại. "Kiểm soát" côn trùng có thể có hoặc có thể không có nghĩa là giết côn trùng, mặc dù tốt hơn nên có nghĩa là giết côn trùng.

Các thuật ngữ "có chứa" hoặc "chứa," khi được dùng trong bản mô tả này, xác định sự có mặt của dấu hiệu, số nguyên, bước, hoạt động, yếu tố, hoặc thành phần được chỉ ra, nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc sự thêm vào của một hoặc nhiều dấu hiệu, số nguyên, bước, hoạt động, yếu tố, thành phần khác, hoặc nhóm của chúng.

Như được sử dụng ở đây, câu chuyển tiếp "về cơ bản gồm có" (và các biến thể ngữ pháp) nghĩa là phạm vi của yêu cầu bảo hộ được hiểu là bao hàm các vật liệu hoặc các bước được nêu rõ hoặc đề cập trong yêu cầu bảo hộ" và những thứ mà không làm thay đổi cốt yếu (các) đặc trưng cơ bản và mới" của sáng chế được yêu cầu bảo hộ. Do đó, thuật ngữ "về cơ bản gồm có" khi được sử dụng trong yêu cầu bảo hộ của sáng chế không dự tính được hiểu là tương đương với "chứa."

Trong ngữ cảnh của sáng chế, "việc tương ứng với" hoặc "tương ứng với" có nghĩa là khi trình tự axit amin của các protein Cry biến thể hoặc tương đồng được sắp xếp thẳng hàng với nhau, các axit amin mà "tương ứng với" các vị trí được đánh số nhất định trong protein biến thể hoặc tương đồng là các axit amin mà thẳng hàng với các vị trí này trong protein tham chiếu nhưng không nhất thiết là ở các vị trí đánh số chính xác này tương quan với trình tự axit amin tham chiếu cụ thể theo sáng chế. Ví dụ, nếu SEQ ID NO:10 là trình tự tham chiếu và được sắp xếp thẳng hàng với SEQ ID NO:12, Met623 của SEQ ID NO:12 "tương ứng với" Met614 của SEQ ID NO:10.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein Cry" có nghĩa là protein diệt côn trùng thuộc loại nội độc tố delta tinh thể *Bacillus thuringiensis*. Thuật ngữ "protein Cry" có thể dùng để chỉ dạng tiền độc tố hoặc mảnh hoặc độc tố có hoạt tính diệt côn trùng bất kỳ của chúng.

Việc "phân phối" chế phẩm hoặc protein gây độc có nghĩa là chế phẩm hoặc protein gây độc tiếp xúc với côn trùng, mà làm thuận lợi cho sự ăn bằng miệng của chế phẩm hoặc protein gây độc, dẫn đến tác dụng gây độc và kiểm soát côn trùng. Chế phẩm hoặc protein gây độc có thể được phân phối theo nhiều cách đã được công nhận, bao gồm nhưng không giới hạn ở, sự biểu hiện cây trồng chuyển gen, (các) chế phẩm protein được tạo chế phẩm, (các) chế phẩm protein có thể phun được, chất nền môi, hoặc hệ thống phân phối protein đã được công nhận trong lĩnh vực khác bất kỳ.

Thuật ngữ "miền" dùng để chỉ tập hợp các axit amin được bảo toàn ở các vị trí cụ thể dọc theo sự sắp xếp thẳng hàng của các trình tự của các protein có liên quan về mặt tiến hóa. Trong khi các axit amin ở các vị trí khác có thể thay đổi giữa các thể tương đồng, các axit amin được bảo toàn cao ở các vị trí cụ thể thể hiện các axit amin mà có vẻ thiết yếu trong cấu trúc, sự ổn định hoặc chức năng của protein. Được xác định bởi mức độ bảo toàn cao của chúng trong các trình tự được sắp xếp thẳng hàng của họ của các thể tương đồng protein, chúng có thể được sử dụng làm dấu hiệu nhận dạng để xác định liệu polypeptit đang xem xét bất kỳ có thuộc vào nhóm polypeptit đã được xác định từ trước hay không.

"Lượng hữu hiệu để kiểm soát côn trùng" có nghĩa là nồng độ của protein gây độc mà ức chế, thông qua tác dụng gây độc, khả năng của côn trùng để sống sót, sinh trưởng, ăn hoặc sinh sản, hoặc hạn chế sự tổn thất hoặc thiệt hại do côn trùng ở cây trồng hoặc bảo vệ tiềm năng sản lượng của cây trồng khi sinh trưởng trong sự có mặt của côn trùng gây hại. "Lượng hữu hiệu để kiểm soát côn trùng" có thể có hoặc không có nghĩa là giết côn trùng, mặc dù tốt hơn nên có nghĩa là giết côn trùng.

"Băng catxet biểu hiện" như được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử axit nucleic có khả năng định hướng sự biểu hiện của ít nhất là một polynucleotit được quan tâm, chẳng hạn như polynucleotit mà mã hóa cho protein Cry theo sáng chế, trong tế bào chủ thích hợp, có chứa vùng khởi động được liên kết có điều khiển với polynucleotit được quan tâm mà được liên kết có điều khiển với tín hiệu kết thúc. "Băng catxet biểu hiện" thường còn chứa polynucleotit bổ sung cần để phiên mã đúng polynucleotit quan tâm. Băng catxet biểu hiện có thể còn chứa polynucleotit khác không cần thiết trong việc biểu hiện trực tiếp của polynucleotit quan tâm nhưng có mặt do vị trí giới hạn thích hợp để loại bỏ băng khởi vật truyền biểu hiện. Băng catxet biểu hiện bao gồm (các) polynucleotit quan tâm có thể là khảm, có nghĩa là ít nhất một

trong số các thành phần của nó là khác loại với ít nhất một trong số các thành phần khác của nó. Băng catxet biểu hiện có thể còn là băng mà có trong tự nhiên nhưng có thể thu được ở dạng tái tổ hợp hữu dụng để biểu hiện khác loài. Tuy nhiên, thông thường, băng catxet biểu hiện là khác loại với vật chủ, tức là polynucleotit quan tâm trong băng catxet biểu hiện không có trong tự nhiên trong tế bào chủ và phải được đưa vào tế bào chủ hoặc tổ tiên của tế bào chủ bằng quá trình biến nạp hoặc quá trình gây giống. Sự biểu hiện của (các) polynucleotit quan tâm trong băng catxet biểu hiện thường là chịu sự kiểm soát của vùng khởi động. Trong trường hợp sinh vật đa bào, như cây trồng, vùng khởi động có thể còn là đặc hiệu hoặc ưu tiên cho mô, hoặc cơ quan, hoặc giai đoạn phát triển cụ thể. Băng catxet biểu hiện, hoặc mảnh của chúng, còn có thể được gọi là "polynucleotit được chèn" hoặc "polynucleotit cài xen" khi được biến nạp vào cây trồng.

"Gen" được xác định trong bản mô tả này là đơn vị di truyền có chứa một hoặc nhiều polynucleotit mà chiếm giữ vị trí cụ thể trên nhiễm sắc thể hoặc plasmid và chứa chỉ thị di truyền đối với đặc điểm hoặc tính trạng cụ thể ở sinh vật.

"Protease của ruột" là proteaza được tìm thấy tự nhiên trong đường tiêu hóa của côn trùng. Proteaza này thường tham gia vào việc tiêu hóa protein được ăn vào. Ví dụ về proteaza của ruột bao gồm trypsin, mà thường phân cắt peptit ở phía đầu tận cùng C của các gốc lysin (K) hoặc arginin (R), và chymotrypsin, mà thường phân cắt peptit ở phía đầu tận cùng C của phenylalanin (F), tryptophan (W) hoặc tyrosin (Y).

Thuật ngữ "khác loại" khi được dùng để đề cập đến gen hoặc polynucleotit hoặc polypeptit dùng để chỉ gen hoặc polynucleotit hoặc polypeptit mà là hoặc chứa một phần của chúng không ở trong môi trường tự nhiên của nó (tức là, đã được thay đổi bởi bàn tay con người). Ví dụ, gen khác loại có thể bao gồm polynucleotit từ một loài được đưa vào loài khác. Gen khác loại cũng có thể bao gồm polynucleotit tự nhiên đối với sinh vật mà đã được thay đổi theo một cách nào đó (ví dụ như, bị đột biến, được bổ sung trong nhiều bản sao, được nối với các polynucleotit vùng khởi động hoặc vùng tăng cường không tự nhiên, v.v.). Gen khác loại còn có thể chứa polynucleotit của gen thực vật mà bao gồm các dạng cADN của gen thực vật; cADN có thể được biểu hiện theo hướng có nghĩa (để tạo ra mRNA) hoặc theo hướng đối nghĩa (để tạo ra bản phiên mã ARN đối nghĩa mà bổ sung với bản phiên mã mRNA). Theo một khía cạnh của sáng chế, gen khác loại phân biệt với gen thực vật nội sinh ở

chỗ polynucleotit của gen khác loại thường nối với polynucleotit bao gồm yếu tố điều hòa như vùng khởi động mà không được phát hiện thấy trong tự nhiên là kết hợp với gen đối với protein được mã hóa bởi gen khác loại hoặc với polynucleotit của gen thực vật trong nhiễm sắc thể, hoặc kết hợp với các phần của nhiễm sắc thể không phát hiện thấy trong tự nhiên (ví dụ, gen được biểu hiện ở các vị trí mà gen không được biểu hiện tự nhiên). Hơn nữa, polynucleotit "khác loại" dùng để chỉ polynucleotit không kết hợp tự nhiên với tế bào chủ mà nó được đưa vào, bao gồm nhiều bản sao không có trong tự nhiên của polynucleotit có trong tự nhiên.

"Tái tổ hợp cùng loại" là sự trao đổi ("lai chéo") của các đoạn ADN giữa hai phân tử ADN hoặc nhiễm sắc tử của các nhiễm sắc thể bắt cặp trong vùng polynucleotit tương đồng. "Sự kiện tái tổ hợp" ở đây được hiểu có nghĩa là lai chéo giảm phân.

Trình tự axit nucleic "đăng mã hóa" với trình tự axit nucleic tham chiếu khi trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit có trình tự axit amin giống như polypeptit được mã hóa bởi trình tự axit nucleic tham chiếu. Ví dụ, SEQ ID NO:4 đăng mã hóa với SEQ ID NO: 1 bởi vì chúng đều mã hóa cho trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO:10.

Thuật ngữ phân tử axit nucleic "được phân lập", polynucleotit hoặc protein là phân tử axit nucleic, polynucleotit hoặc protein mà không còn tồn tại trong môi trường tự nhiên của nó. Phân tử axit nucleic, polynucleotit hoặc protein được phân lập theo sáng chế có thể tồn tại ở dạng tinh chế hoặc có thể tồn tại trong vật chủ tái tổ hợp chẳng hạn như trong vi khuẩn chuyển gen hoặc cây trồng chuyển gen.

"Phân tử axit nucleic" là ADN hoặc ARN mạch đơn hoặc kép mà có thể được phân lập từ nguồn bất kỳ. Trong ngữ cảnh của sáng chế, phân tử axit nucleic tốt hơn là đoạn của ADN.

"Liên kết có điều khiển" dùng để chỉ sự liên kết của polynucleotit trên đoạn axit nucleic đơn sao cho chức năng của cái này ảnh hưởng đến chức năng của cái kia. Ví dụ, vùng khởi động liên kết có điều khiển với polynucleotit mã hóa hoặc ARN chức năng khi nó có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của polynucleotit mã hóa hoặc ARN chức năng đó (tức là, polynucleotit mã hóa hoặc ARN chức năng đó nằm dưới sự kiểm

soát phiên mã của vùng khởi động). Polynucleotit mã hóa theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa có thể liên kết có điều khiển với polynucleotit điều hòa.

Như được sử dụng ở đây "diệt loài gây hại," diệt côn trùng," và tương tự, dùng để chỉ khả năng của protein Cry theo sáng chế để kiểm soát sinh vật gây hại hoặc lượng của protein Cry mà có thể kiểm soát sinh vật gây hại như được định nghĩa ở đây. Do đó, protein Cry diệt loài gây hại có thể giết chết hoặc ức chế khả năng của sinh vật gây hại (ví dụ như, côn trùng gây hại) để sống sót, sinh trưởng, ăn, hoặc sinh sản.

"Cây trồng" là cây trồng bất kỳ ở giai đoạn phát triển bất kỳ, cụ thể là cây trồng có hạt.

"Tế bào của cây" là đơn vị cấu trúc và sinh lý của cây trồng, bao gồm tế bào trần và thành tế bào. Tế bào của cây có thể dưới dạng tế bào đơn được phân lập hoặc tế bào được nuôi cấy, hoặc là một phần của đơn vị được tổ chức cao hơn như, ví dụ, mô cây trồng, cơ quan của cây, hoặc toàn bộ cây.

"Mề nuôi cấy tế bào của cây" nghĩa là mề nuôi cấy các đơn vị của cây như, ví dụ, tế bào trần, tế bào nuôi cấy tế bào, tế bào trong mô cây trồng, phấn hoa, ống phấn, noãn, túi phôi, hợp tử và phôi ở giai đoạn phát triển khác nhau.

"Nguyên liệu cây" dùng để chỉ lá, thân, rễ, hoa hoặc các bộ phận của hoa, quả, phấn hoa, tế bào trứng, hợp tử, hạt, cành giâm, mề nuôi cấy tế bào hoặc mô, hoặc bất kỳ bộ phận hoặc sản phẩm khác của cây trồng.

"Cơ quan của cây" là phần được cấu trúc và phân biệt rõ ràng và nhìn thấy được của cây trồng như rễ, thân, lá, nụ hoa, hoặc phôi.

"Mô cây trồng" như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là nhóm tế bào của cây được tổ chức thành một đơn vị cấu trúc và chức năng. Mô cây trồng bất kỳ *trong thử nghiệm ở thực vật* hoặc trong nuôi cấy đều được bao gồm. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cây trồng nguyên vẹn, cơ quan cây trồng, hạt cây trồng, môi trường nuôi cấy mô và nhóm bất kỳ của tế bào cây trồng được tổ chức thành các đơn vị cấu trúc hoặc chức năng. Việc sử dụng các thuật ngữ này kết hợp với, hoặc không có mặt, dạng đặc trưng bất kỳ của mô cây trồng như được liệt kê ở trên

hoặc bao gồm dạng khác theo định nghĩa ngày không nhằm loại trừ bất kỳ dạng nào của mô cây trồng.

"Polynucleotit" dùng để chỉ polyme gồm có nhiều monome nucleotit liên kết cộng hóa trị trong mạch. "Polynucleotit" này bao gồm ADN, ARN, oligonucleotit được cải biến (ví dụ, oligonucleotit bao gồm các bazơ mà không cơ bản đối với ARN hoặc ADN sinh học, như oligonucleotit được 2'-O-metyl hóa), và dạng tương tự. Theo một số phương án, axit nucleic hoặc polynucleotit có thể là sợi đơn, sợi đôi, đa sợi, hoặc các dạng kết hợp của chúng. Trừ khi có chỉ định khác, axit nucleic hoặc polynucleotit cụ thể theo sáng chế tùy ý bao gồm hoặc mã hóa cho polynucleotit bổ sung, ngoài polynucleotit được chỉ rõ bất kỳ.

"Polynucleotit được quan tâm" dùng để chỉ polynucleotit bất kỳ mà, khi được chuyển vào sinh vật, ví dụ như, thực vật, mang lại cho sinh vật đặc điểm mong muốn chẳng hạn như tính kháng côn trùng, tính kháng bệnh, khả năng dung chịu chất diệt cỏ, tính kháng kháng sinh, giá trị dinh dưỡng được cải thiện, hiệu suất trong quy trình công nghiệp được cải thiện, sản xuất enzym hoặc chất chuyển hóa có giá trị thương mại hoặc khả năng sinh sản được thay đổi.

Thuật ngữ "vùng khởi động" dùng để chỉ polynucleotit, thường ngược dòng (5') với polynucleotit mã hóa của nó, mà kiểm soát sự biểu hiện của polynucleotit mã hóa bằng cách tạo ra nhận diện cho ARN polymeraza và các yếu tố khác cần để phiên mã đúng.

"Tế bào trần" là tế bào cây trồng được phân lập mà không có thành tế bào hoặc chỉ có các phần của thành tế bào.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tái tổ hợp" dùng để chỉ dạng axit nucleic (ví dụ như, ADN hoặc ARN) hoặc protein hoặc sinh vật mà không thường được tìm thấy trong tự nhiên và như vậy được tạo ra bởi sự can thiệp của con người. Như được dùng trong bản mô tả này, "phân tử axit nucleic tái tổ hợp" là phân tử axit nucleic có chứa sự kết hợp của các polynucleotit mà không cùng có trong tự nhiên và là kết quả của sự can thiệp của con người, ví dụ như, phân tử axit nucleic mà gồm có sự kết hợp của ít nhất là hai polynucleotit khác loại với nhau, hoặc phân tử axit nucleic mà được tổng hợp nhân tạo và có chứa polynucleotit mà bắt nguồn từ polynucleotit mà thường tồn tại trong tự nhiên, hoặc phân tử axit nucleic mà có chứa gen chuyển được

kết hợp nhân tạo vào ADN hệ gen của tế bào chủ và ADN lẻ kèm theo của hệ gen của tế bào chủ. Ví dụ về phân tử axit nucleic tái tổ hợp là phân tử ADN thu được từ sự cài xen của gen chuyển vào ADN hệ gen của thực vật, mà cuối cùng có thể dẫn đến sự biểu hiện của phân tử ARN hoặc protein tái tổ hợp trong sinh vật đó. Như được dùng trong bản mô tả này, "thực vật tái tổ hợp" là thực vật mà không thường tồn tại trong tự nhiên, là kết quả của sự can thiệp của con người, và chứa gen chuyển hoặc phân tử axit nucleic khác loại kết hợp vào hệ gen của nó. Do việc thay đổi hệ gen này, thực vật tái tổ hợp rõ ràng khác với thực vật kiểu đại liên quan.

"Các yếu tố điều hòa" dùng để chỉ các trình tự liên quan đến sự kiểm soát biểu hiện của trình tự nucleotit. Các yếu tố điều hòa bao gồm vùng khởi động liên kết có điều khiển với trình tự nucleotit mong muốn và các tín hiệu kết thúc. Chúng cũng thường bao hàm trình tự cần cho sự dịch mã thích hợp của trình tự nucleotit.

Thuật ngữ "độ tương đồng" hoặc "đồng nhất" hoặc "về cơ bản là đồng nhất," trong ngữ cảnh của hai trình tự axit nucleic hoặc axit amin, dùng để chỉ hai hoặc nhiều trình tự hoặc trình tự con mà có độ tương đồng gốc nucleotit hoặc axit amin ít nhất là 60%, tốt hơn là ít nhất là 80%, tốt hơn nữa là ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là ít nhất là 95%, và tốt nhất là ít nhất là 99%, khi được so sánh và được sắp xếp thẳng hàng đối với sự tương ứng lớn nhất, như được đo bằng cách sử dụng một trong các thuật toán so sánh trình tự sau đây hoặc bằng cách quan sát bằng mắt. Tốt hơn là, độ tương đồng đáng kể tồn tại ở vùng của các trình tự mà dài ít nhất là khoảng 50 gốc hoặc bazơ, tốt hơn nữa là ở vùng có ít nhất là khoảng 100 gốc hoặc bazơ, và tốt nhất là các trình tự về cơ bản là đồng nhất ở ít nhất là khoảng 150 gốc hoặc bazơ. Theo phương án được đặc biệt ưu tiên, các trình tự về cơ bản là tương đồng trên toàn bộ chiều dài của vùng mã hóa. Hơn nữa, trình tự axit nucleic hoặc axit amin về cơ bản là đồng nhất thực hiện về cơ bản là cùng chức năng.

Để so sánh trình tự, điển hình là một trình tự đóng vai trò như trình tự tham chiếu mà trình tự thử nghiệm được so sánh với nó. Khi dùng thuật toán so sánh trình tự, các trình tự thử nghiệm và tham chiếu được nhập vào máy tính, sau đó các hệ tọa độ được chỉ định nếu cần và các thông số của chương trình thuật toán trình tự được chỉ định. Thuật toán so sánh trình tự sau đó sẽ tính toán tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự của (các) trình tự thử nghiệm so với trình tự tham chiếu, dựa trên các thông số chương trình được chỉ định.

Sự sắp xếp thẳng hàng tối ưu của các trình tự để so sánh có thể được thực hiện, ví dụ như, bằng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), bằng thuật toán sắp xếp thẳng hàng tương đồng của Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), bằng cách tra cứu phương pháp độ tương tự của Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444 (1988), bằng cách thực hiện vi tính hóa của các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong Gói Phần Mềm Di Truyền Học Wisconsin (Wisconsin Genetics Software Package), Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), hoặc bằng cách quan sát bằng mắt (thường xem trong tài liệu, Ausubel et al., *infra*).

Một ví dụ về thuật toán mà thích hợp để xác định tỷ lệ phần trăm tương đồng trình tự và tính tương đồng trình tự là thuật toán BLAST, mà được mô tả trong Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). Phần mềm để thực hiện phân tích BLAST được công bố qua Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 USA). Thuật toán này liên quan đến việc xác định trước tiên các cặp trình tự có điểm cao (các HSP) bằng cách xác định các từ ngắn của chiều dài W trong trình tự truy vấn, mà hoặc là tương xứng hoặc là thỏa mãn điểm ngưỡng T nào đó có giá trị dương khi được sắp thẳng hàng với từ có cùng chiều dài trong trình tự cơ sở dữ liệu. T được gọi là ngưỡng điểm của từ lân cận (Altschul et al., 1990). Các tương hợp từ lân cận khởi đầu này có tác dụng như hạt giống để bắt đầu tìm kiếm các HSP dài hơn có chứa chúng. Các tương hợp từ này sau đó được mở rộng theo cả hai hướng dọc theo mỗi trình tự xa tới mức điểm sắp thẳng hàng tích lũy có thể tăng lên. Các điểm tích lũy được tính bằng cách sử dụng, đối với trình tự nucleotit, thông số M (điểm thưởng đối với cặp các gốc tương hợp; luôn luôn >0) và N (điểm phạt đối với các cặp không tương hợp; luôn luôn <0). Đối với các trình tự axit amin, ma trận điểm được dùng để tính toán điểm tích lũy. Việc mở rộng các tương hợp từ theo mỗi hướng tạm dừng lại khi điểm sắp thẳng hàng tích lũy giảm tới lượng X kể từ giá trị đạt được tối đa của nó, điểm tích lũy tiến tới không hoặc thấp hơn do tích lũy một hoặc nhiều phép sắp thẳng hàng nhóm có điểm âm, hoặc đạt đến điểm cuối của trình tự nào đó. Các thông số W, T, và X của thuật toán BLAST xác định độ nhạy và tốc độ của phép sắp thẳng hàng. Chương trình BLASTN (cho các trình tự nucleotit) dùng mặc định độ dài từ (W) là 11, mức mong đợi (E) là 10, ngưỡng giới hạn là 100,

M=5, N=-4, và so sánh cả hai mạch. Đối với các trình tự axit amin, chương trình BLASTP sử dụng làm mặc định độ dài từ (W) bằng 3, kỳ vọng (E) bằng 10, và ma trận điểm BLOSUM62 (xem Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

Ngoài việc tính tỷ lệ phần trăm độ tương đồng trình tự, thuật toán BLAST còn thực hiện phân tích thống kê độ tương tự giữa hai trình tự (xem, ví dụ, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Một phép đo tương tự được đưa ra bởi thuật toán BLAST là xác suất tổng nhỏ nhất (P(N)), nó cho chỉ dấu về xác suất mà do nó, tương xứng giữa hai trình tự nucleotit hoặc axit amin có thể ngẫu nhiên xảy ra. Ví dụ, trình tự axit nucleic thử nghiệm được coi là tương tự với trình tự tham chiếu nếu tổng xác suất nhỏ nhất khi so sánh trình tự axit nucleic thử nghiệm với trình tự axit nucleic tham chiếu nhỏ hơn khoảng 0,1, tốt hơn nữa là nhỏ hơn khoảng 0,01, và tốt nhất là nhỏ hơn khoảng 0,001.

Dấu hiệu khác cho thấy hai trình tự axit nucleic căn bản là đồng nhất là hai phân tử lai với nhau dưới các điều kiện nghiêm ngặt. Câu "lai đặc hiệu" dùng để chỉ sự liên kết, ghép đôi, hoặc lai phân tử chỉ với trình tự nucleotit cụ thể dưới các điều kiện nghiêm ngặt khi mà trình tự này có mặt trong hỗn hợp phức (ví dụ, tế bào tổng số) ADN hoặc ARN. "Về cơ bản liên kết" dùng để chỉ việc lai bổ sung giữa axit nucleic dò và axit nucleic đích và bao gồm các lỗi bắt cặp nhỏ mà có thể điều tiết bằng cách giảm sự nghiêm ngặt của môi trường lai để thu được việc dò trình tự axit nucleic đích mong muốn.

"Các điều kiện lai nghiêm ngặt" và "các điều kiện rửa lai nghiêm ngặt" trong ngữ cảnh các thử nghiệm lai axit nucleic như lai Southern và Northern là phụ thuộc trình tự, và khác nhau theo các thông số môi trường khác nhau. Các trình tự càng dài lai đặc hiệu ở các nhiệt độ càng cao. Hướng dẫn khái quát về lai axit nucleic được tìm thấy trong Kỹ thuật thí nghiệm Tijssen (1993) trong Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, New York. Thông thường, các điều kiện lai và rửa nghiêm ngặt cao được chọn là thấp hơn khoảng 5°C so với điểm nóng chảy nhiệt (T_m) cho trình tự cụ thể ở cường độ ion và độ pH xác định. Thông thường, dưới "các điều kiện

nghiêm ngặt" trình tự dò sẽ lai với trình tự phụ đích, mà không lai với các trình tự khác.

T_m là nhiệt độ (ở cường độ ion và độ pH xác định) mà ở đó 50% trình tự đích lai với trình tự dò bắt cặp hoàn toàn. Các điều kiện rất nghiêm ngặt được chọn là bằng T_m đối với đoạn dò cụ thể. Ví dụ của các điều kiện lai nghiêm ngặt để lai axit nucleic bổ sung mà có hơn 100 gốc bổ sung trên dụng cụ lọc trong kỹ thuật lai thẩm tách Southern hoặc northern là 50% formamit với 1mg heparin ở 42°C, với việc lai được thực hiện qua đêm. Ví dụ của các điều kiện rửa nghiêm ngặt cao là 0,15M NaCl ở 72°C trong khoảng 15 phút. Ví dụ của các điều kiện rửa nghiêm ngặt là rửa 0,2× SSC ở 65°C trong 15 phút (xem, Sambrook, dưới đây, đối với mô tả đệm SSC). Thông thường, việc rửa có độ nghiêm ngặt cao được thực hiện sau khi rửa nghiêm ngặt thấp để tách dấu hiệu dò của nền. Việc rửa có độ nghiêm ngặt trung bình ví dụ đối với ghép đôi của, ví dụ, hơn 100 nucleotit, là 1× SSC ở 45°C trong 15 phút. Việc rửa có độ nghiêm ngặt thấp ví dụ đối với ghép đôi của, ví dụ, hơn 100 nucleotit, là 4-6× SSC ở 40°C trong 15 phút. Đối với các trình tự dò ngắn (ví dụ, khoảng 10 đến 50 nucleotit), các điều kiện nghiêm ngặt thường liên quan đến các nồng độ muối nhỏ hơn khoảng 1,0 M ion Na, thường nồng độ khoảng 0,01 đến 1,0 M ion Na (hoặc các muối khác) ở pH 7,0 đến 8,3, và nhiệt độ thường ít nhất khoảng 30°C. Các điều kiện nghiêm ngặt còn có thể thu được với điều kiện của các tác nhân gây mất ổn định như formamit. Thông thường, tín hiệu đối với tỷ lệ nhiều hơn gấp 2× (hoặc cao hơn) quan sát được đối với trình tự dò không liên quan trong thử nghiệm lai cụ thể cho thấy phát hiện lai đặc hiệu. Các axit nucleic mà không lai với nhau trong điều kiện nghiêm ngặt về cơ bản vẫn giống nhau nếu các protein mà chúng mã hóa cho về cơ bản giống nhau. Điều này xảy ra, ví dụ, khi bản sao của axit nucleic được tạo ra bằng cách sử dụng sự thoái hóa bộ ba mã hóa lớn nhất cho phép bởi mã di truyền.

Sau đây là các ví dụ của bộ các điều kiện lai/rửa mà có thể được sử dụng để tách dòng trình tự nucleotit cùng loại mà cơ bản tương đồng với trình tự nucleotit tham chiếu theo sáng chế: trình tự nucleotit tham chiếu tốt hơn là lai với trình tự nucleotit tham chiếu trong 7% natri dodecyl sulfat (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1 mM EDTA ở 50°C với rửa trong 2× SSC, 0,1% SDS ở 50°C, mong muốn hơn là trong 7% natri dodecyl sulfat (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1 mM EDTA ở 50°C với rửa trong 1× SSC, 0,1% SDS ở 50°C, mong muốn hơn nữa là trong 7% natri dodecyl sulfat (SDS), 0,5 M NaPO₄, 1

mM EDTA ở 50°C với rửa trong $0,5\times$ SSC, 0,1% SDS ở 50°C, tốt hơn là trong 7% natri dodecyl sulfat (SDS), 0,5 M NaPO_4 , 1 mM EDTA ở 50°C với rửa trong $0,1\times$ SSC, 0,1% SDS ở 50°C, tốt hơn nữa là trong 7% natri dodecyl sulfat (SDS), 0,5 M NaPO_4 , 1 mM EDTA ở 50°C với rửa trong $0,1\times$ SSC, 0,1% SDS ở 65°C.

Dấu hiệu khác của việc hai trình tự axit nucleic hoặc protein về cơ bản giống nhau là protein được mã hóa bởi axit nucleic thứ nhất phản ứng chéo về mặt miễn dịch với, hoặc liên kết đặc hiệu với, protein được mã hóa bởi axit nucleic thứ hai. Do đó, protein này thường là về cơ bản giống với protein thứ hai, ví dụ, trong đó hai protein chỉ khác nhau bởi sự thể bảo toàn.

"Tổng hợp" dùng để chỉ trình tự nucleotit có chứa bazơ hoặc dấu hiệu cấu trúc mà không có mặt trong trình tự tự nhiên. Ví dụ, trình tự nhân tạo mã hóa cho protein Cry theo sáng chế mà tương tự gần hơn về hàm lượng G+C và sự phân bố bộ ba mã hóa bình thường của gen thực vật hai lá mầm hoặc một lá mầm được coi là tổng hợp.

Như được dùng trong bản mô tả này, protein Cry mà "gây độc" đối với côn trùng gây hại có nghĩa là protein Cry đóng vai trò làm tác nhân kiểm soát côn trùng theo đường miệng để giết chết côn trùng gây hại, hoặc protein Cry có thể phá vỡ hoặc ngăn cản việc ăn của côn trùng, hoặc gây ra sự ức chế sinh trưởng đối với côn trùng gây hại, cả hai có thể gây ra hoặc không gây ra cái chết của côn trùng. Khi protein Cry theo sáng chế được phân phối đến côn trùng hoặc côn trùng trở nên tiếp xúc bằng miệng với protein Cry, kết quả thường là cái chết của côn trùng, hoặc sự sinh trưởng của côn trùng bị chậm lại, hoặc côn trùng ngừng ăn khi nguồn tạo ra protein gây độc Cry có sẵn đối với côn trùng.

"Biến nạp" là quá trình đưa axit nucleic khác loại vào tế bào chủ hoặc sinh vật. Cụ thể là, "biến nạp" nghĩa là sự tích hợp ổn định phân tử ADN vào hệ gen của sinh vật mong muốn.

"Được biến nạp/chuyển gen/tái tổ hợp" dùng để chỉ sinh vật chủ như vi khuẩn hoặc thực vật mà phân tử axit nucleic khác loại được đưa vào đó. Phân tử axit nucleic có thể được tích hợp ổn định vào hệ gen của vật chủ hoặc phân tử axit nucleic cũng có thể hiện diện như một phân tử ngoài nhiễm sắc thể. Phân tử ngoài nhiễm sắc thể này có thể tự sao chép. Các tế bào, mô hoặc cây được biến nạp được hiểu là không chỉ chứa sản phẩm cuối của quá trình biến nạp mà còn chứa cả thể con cái chuyển gen

của nó. Vật chủ "không biến nạp", "không chuyển gen", hoặc "không tái tổ hợp" đề cập đến sinh vật kiểu đại, ví dụ, vi khuẩn hoặc thực vật, mà không chứa phân tử axit nucleic khác loại.

Các nucleotit được xác định bởi các bazơ của chúng nhờ các chữ viết tắt chuẩn sau đây: adenin (A), xytosin (C), tymin (T), và guanin (G). Tương tự các axit amin được biểu thị bằng các chữ viết tắt tiêu chuẩn sau: alanin (Ala; A), arginin (Arg; R), asparagin (Asn; N), axit aspartic (Asp; D), xystein (Cys; C), glutamin (Gln; Q), axit glutamic (Glu; E), glyxin (Gly; G), histidin (His; H), isoleuxin (Ile; I), leuxin (Leu; L), lysin (Lys; K), methionin (Met; M), phenylalanin (Phe; F), prolin (Pro; P), serin (Ser; S), threonin (Thr; T), tryptophan (Trp; W), tyrosin (Tyr; Y), và valin (Val; V).

Sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp để kiểm soát loài gây hại cây trồng. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến protein Cry mà có thể được phân lập từ vi khuẩn, chẳng hạn như *Bacillus thuringiensis*, mà gây độc đối với côn trùng gây hại và đề cập đến polynucleotit mà có chứa trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein Cry, và đề cập đến việc tạo ra và sử dụng polynucleotit và protein Cry để kiểm soát côn trùng gây hại.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử axit nucleic hoặc một cách tùy ý phân tử axit nucleic được phân lập có chứa trình tự nucleotit mã hóa cho protein Cry ở dạng tiền độc tố của nó hoặc mảnh có hoạt tính sinh học hoặc độc tố của chúng, trong đó trình tự nucleotit (a) có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3 hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng; hoặc (b) mã hóa cho protein có chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12 hoặc mảnh độc tố của chúng; hoặc (c) là trình tự tổng hợp của (a) hoặc (b) mà đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở sinh vật chuyển gen. Theo phương án khác, trình tự nucleotit có chứa trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3 hoặc mảnh mã hóa cho độc tố bất kỳ của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3. Theo phương án khác, trình tự tổng hợp nucleotit có chứa trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9 hoặc mảnh mã hóa cho độc tố bất kỳ của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9.

Polynucleotit mà là mảnh của polynucleotit mã hóa cho tiền độc tố protein Cry cũng được bao hàm bởi sáng chế. "Mảnh" được dự định là phần của trình tự nucleotit

mã hóa cho protein Cry. Mảnh của trình tự nucleotit có thể mã hóa cho phần có hoạt tính sinh học của protein Cry, gọi là "mảnh độc tố," hoặc nó có thể là mảnh mà có thể được dùng làm đoạn dò lai hóa hoặc đoạn mồi PCR bằng cách sử dụng phương pháp được bộc lộ dưới đây. Phân tử axit nucleic mà là mảnh của trình tự nucleotit mã hóa cho protein Cry có chứa ít nhất là khoảng 15, 20, 50, 75, 100, 200, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450 nucleotit liên tiếp, hoặc lên đến số lượng của nucleotit có mặt trong trình tự nucleotit mã hóa cho protein Cry nguyên chiều dài được bộc lộ trong bản mô tả này (ví dụ, 1875 nucleotit đối với SEQ ID NO:1) tùy thuộc vào việc sử dụng dự kiến. Các nucleotit "liên tiếp" được dự định là các gốc nucleotit mà liền kề nhau. Một số mảnh của trình tự nucleotit theo sáng chế mã hóa cho mảnh độc tố mà giữ lại hoạt tính sinh học của protein Cry và, do đó, giữ lại hoạt tính diệt côn trùng. "Giữ lại hoạt tính diệt côn trùng" được dự định là việc mảnh này có ít nhất là khoảng 30%, tốt hơn là ít nhất là khoảng 50%, tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 70%, tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 80% của hoạt tính diệt côn trùng của protein Cry. Phương pháp đo hoạt tính diệt côn trùng đã được biết rõ trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,743,477, tất cả các tài liệu này được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Mảnh độc tố của protein Cry theo sáng chế mã hóa cho ít nhất là khoảng 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, và 450 axit amin liên tiếp, hoặc lên đến tổng số lượng của axit amin có mặt trong protein Cry nguyên chiều dài theo sáng chế (ví dụ, 623 axit amin đối với SEQ ID NO:10).

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic theo sáng chế có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự nucleotit mã hóa cho protein Cry có chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12 hoặc mảnh độc tố của chúng. Theo một số phương án khác, trình tự axit amin có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12 hoặc mảnh độc tố của chúng. Do đó, theo một số phương án, protein Cry mà đã được hoạt hóa bằng phương thức xử lý phân giải protein, ví dụ, bằng proteaza được điều chế từ ruột côn trùng, có thể được xác định đặc

điểm và các axit amin ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của mảnh độc tố đã hoạt hóa được xác định. Theo khía cạnh này của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định rằng, ví dụ, mảnh độc tố có SEQ ID NO:10 có thể có chứa các axit amin từ khoảng 43 đến khoảng 623 hoặc từ khoảng 44 đến khoảng 623 của SEQ ID NO:10, hoặc mảnh độc tố có SEQ ID NO:11 có thể có chứa các axit amin từ khoảng axit amin 41 đến khoảng 598 hoặc từ khoảng 41 đến khoảng 631 hoặc từ khoảng 42 đến khoảng 631 hoặc từ khoảng 42 đến 631 của SEQ ID NO:11, hoặc mảnh độc tố có SEQ ID NO:12 có thể có chứa các axit amin từ khoảng axit amin 42 đến khoảng 585 hoặc từ khoảng 42 đến khoảng 633 hoặc từ khoảng axit amin 43 đến khoảng 585 hoặc từ khoảng 43 đến khoảng 633 của SEQ ID NO:12. Biến thể protein Cry được tạo ra bằng cách đưa vào hoặc triệt tiêu vị trí xử lý proteaza ở các vị trí thích hợp trong trình tự mã hóa để cho phép, hoặc triệt tiêu, sự phân cắt phân giải protein của protein biến thể lớn hơn bởi proteaza côn trùng, thực vật hoặc vi sinh vật cũng thuộc phạm vi của sáng chế. Kết quả cuối cùng của thao tác này được hiểu là sự tạo ra của phân tử mảnh độc tố có cùng hoạt tính hoặc hoạt tính tốt hơn so với protein tiền độc tố Cry nguyên vẹn.

Theo một số phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất gen khảm mà có chứa vùng khởi động khác loại được liên kết có điều khiển với polynucleotit có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein Cry gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, trong đó trình tự nucleotit (a) có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% (ví dụ như, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%) đến ít nhất là 99% (99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%) với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng; hoặc (b) mã hóa cho protein có chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% (ví dụ như, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%) đến ít nhất là 99% (99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%) với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12, hoặc mảnh độc tố của chúng; hoặc (c) là trình tự tổng hợp của (a) hoặc (b) mà đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở sinh vật chuyển gen.

Theo các phương án khác, vùng khởi động khác loại là vùng khởi động có thể biểu hiện ở thực vật. Ví dụ, mà không làm giới hạn sáng chế, vùng khởi động có thể biểu hiện ở thực vật có thể được chọn từ nhóm của các vùng khởi động gồm có các vùng khởi động ubiquitin, virus cestrum vàng, TrpA ngô, OsMADS 6, histon H3 ngô, UTR 5' gen 9 T3 thực khuẩn thể, sucroza synthetaza ngô 1, rượu dehydrogenaza ngô 1, phức hệ thu nhận ánh sáng ở ngô, protein sốc nhiệt ở ngô, mtl ngô, RuBP carboxylaza tiểu đơn vị nhỏ ở đậu Hà Lan, actin ở lúa, xyclophilin ở lúa, mannopine syntaza plasmit Ti, nopaline syntaza plasmit Ti, chalcone isomeraza ở dạ yên thảo, protein giàu glyxin 1 ở đậu, patatin khoai tây, lectin, RuBP carboxylaza tiểu đơn vị nhỏ CaMV 35S và S-E9.

Theo các phương án bổ sung, protein được mã hóa bởi gen khả năng gây độc đối với một hoặc nhiều loài gây hại là sâu bọ cánh vảy được chọn từ nhóm gồm có sâu đục thân ngô châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu ngài đêm màu đen (*Agrotis ipsilon*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu bướm đậu nhung (*Anticarsia gemmatilis*), sâu đo hại đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu đục thân ngô tây nam (*Diatraea grandiosella*), sâu ngài đêm hại đậu phương tây (*Richia albicosta*), sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu đục thân ngô châu Á (*Ostrinia furnacalis*), sâu đục quả bông (*Helicoverpa armigera*), sâu đục thân có sọc (*Chilosuppressalis*), sâu đục thân màu hồng (*Sesamia calamistis*) và sâu cuốn lá lúa (*Cnaphalocrocis medinalis*).

Theo phương án khác, polynucleotit có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự nucleotit mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với SEQ ID NO:1, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng, hoặc có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với SEQ ID NO:2, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng, hoặc có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với SEQ ID NO:3, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Theo phương án khác, polynucleotit có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Theo phương án khác, polynucleotit có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình

tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:10, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:11, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:12, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo một số phương án, gen khảm theo sáng chế có chứa polynucleotit có chứa trình tự tổng hợp của trình tự nucleotit mà có ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là

98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9, trong đó trình tự tổng hợp đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện là sinh vật chuyển gen. Theo phương án khác, gen khám theo sáng chế có chứa polynucleotit có chứa trình tự tổng hợp của trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein có chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng, trong đó trình tự tổng hợp đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện là sinh vật chuyển gen. Theo các phương án khác nữa, sinh vật chuyển gen là vi khuẩn chuyển gen hoặc cây trồng chuyển gen.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit tổng hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein mà gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, trong đó trình tự nucleotit này có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit tổng hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein mà gây độc đối với

loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, trong đó trình tự nucleotit này mã hóa cho trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Protein Cry theo sáng chế có thể được phân lập từ các chủng *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) nhất định chẳng hạn như C0633, C0724 và C1100. Sẽ nhận ra rằng protein Cry theo sáng chế cũng có thể được phân lập từ các chủng *Bt* khác và rằng các chủng *Bt* này có thể được phân lập bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn và được thử nghiệm về độc tính đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy theo sáng chế. Thông thường các chủng *Bt* có thể được phân lập từ mẫu môi trường bất kỳ, bao gồm đất, thực vật, côn trùng, bụi nâng hạt, và nguyên liệu mẫu khác, v.v., bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Travers et al. (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53:1263-1266; Saleh et al. (1969) Can J. Microbiol. 15:1101-1104; DeLucca et al. (1981) Can J. Microbiol. 27:865-870; và Norris, et al. (1981) "The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*," In Starr et al. (eds.), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, Vol. II, Springer-Verlog Berlin Heidelberg. Sau khi phân lập, các chủng *Bt* có thể được thử nghiệm về độc tính đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy và protein Cry được bao hàm bởi sáng chế có thể được xác định. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chủng *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) được phân lập mà sản xuất protein Cry hoặc protein Cry tái tổ hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% so với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 10-12. Theo phương án khác, chủng *Bt* được chọn từ nhóm gồm có C0633, C0724 và C1100. Theo phương án khác nữa, protein Cry hoặc protein Cry tái tổ hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất protein Cry được phân lập một cách tùy ý mà gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, trong đó protein có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có (a) trình tự axit amin mà có từ độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% đến độ tương đồng trình tự ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng; hoặc (b) trình tự axit amin mà được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà có từ độ tương đồng trình tự ít nhất là 80% đến độ tương đồng trình tự ít nhất là 99% với trình tự nucleotit được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Theo phương án khác, protein Cry được phân lập một cách tùy ý có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng. Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:10, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:11, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 93%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là

99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:12, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo một số phương án, trình tự axit amin có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng. Theo phương án khác, trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Theo phương án khác, protein Cry theo sáng chế gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vẩy được chọn từ nhóm gồm có sâu đục thân ngô châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu ngài đêm màu đen (*Agrotis ipsilon*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu bướm đậu nhung (*Anticarsia gemmatilis*), sâu đo hại đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu đục thân ngô tây nam (*Diatraea grandiosella*), sâu ngài đêm hại đậu phương tây (*Richia albicosta*), sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu đục thân ngô châu Á (*Ostrinia furnacalis*), sâu đục quả bông (*Helicoverpa armigera*), sâu đục thân có sọc (*Chilosuppressalis*), sâu đục thân màu hồng (*Sesamia calamistis*) và sâu cuốn lá lúa (*Cnaphalocrocis medinalis*).

Theo một số phương án, sáng chế bao hàm protein Cry tái tổ hợp mà gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vẩy, trong đó protein Cry tái tổ hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có (a) trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự axit amin được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng; hoặc (b) trình tự axit amin mà được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà có độ tương đồng trình tự từ 80% đến ít nhất là 99% với trình tự nucleotit được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Theo phương án khác, protein Cry tái tổ hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự axit amin mà có độ tương đồng trình tự từ ít nhất là 80% đến ít nhất là 99% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng. Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc

là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:13, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:14, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác nữa, trình tự axit amin có độ tương đồng trình tự ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 81%, hoặc ít nhất là 82%, hoặc ít nhất là 83%, hoặc ít nhất là 84%, hoặc ít nhất là 85%, hoặc ít nhất là 86%, hoặc ít nhất là 87%, hoặc ít nhất là 88%, hoặc ít nhất là 89%, hoặc ít nhất là 90%, hoặc ít nhất là 91%, hoặc ít nhất là 92%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 94%, hoặc ít nhất là 95%, hoặc ít nhất là 96%, hoặc ít nhất là 97%, hoặc ít nhất là 98%, hoặc ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 99,1%, hoặc ít nhất là 99,2%, hoặc ít nhất là 99,3%, hoặc ít nhất là 99,4%, hoặc ít nhất là 99,5% hoặc ít nhất là 99,6%, hoặc ít nhất là 99,7%, hoặc ít nhất là 99,8%, hoặc ít nhất là 99,9% với SEQ ID NO:15, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác nữa, protein Cry tái tổ hợp có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng. Theo phương án khác, protein Cry tái tổ hợp được mã hóa bởi trình tự nucleotit mà có chứa, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng.

Kháng thể mà được tạo ra trong đáp ứng với thử thách miễn dịch bởi BT-0016, BT-0026 và BT-0032 tự nhiên hoặc đột biến và dạng tương tự hoặc protein Cry có liên quan cũng được bao hàm bởi sáng chế. Kháng thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật miễn dịch học tiêu chuẩn để sản xuất kháng huyết thanh đa dòng và, nếu muốn, làm bất tử tế bào sản xuất kháng thể của vật chủ được gây miễn dịch để có nguồn sản xuất kháng thể đơn dòng. Kỹ thuật sản xuất kháng thể đối với

chất bất kỳ được quan tâm đã được biết rõ, ví dụ như, như trong tài liệu Harlow and Lane (1988. Antibodies a laboratory manual. pp. 726. Cold Spring Harbor Laboratory) và như trong tài liệu Goding (Monoclonal Antibodies: Principles & practice.1986. Academic Press, Inc., Orlando, FL). Sáng chế bao hàm protein diệt côn trùng mà tương tác chéo với kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng, được tạo ra để chống lại một hoặc nhiều protein diệt côn trùng Cry theo sáng chế.

Kháng thể được tạo ra trong sáng chế cũng hữu dụng trong thử nghiệm miễn dịch để xác định hàm lượng hoặc sự có mặt của BT-0016, BT-0026 và BT-0032 tự nhiên hoặc đột biến hoặc protein Cry có liên quan trong mẫu sinh học. Các thử nghiệm này cũng hữu dụng trong sự sản xuất có kiểm soát chất lượng của chế phẩm có chứa một hoặc nhiều protein Cry theo sáng chế hoặc các protein gây độc có liên quan. Ngoài ra, kháng thể có thể được sử dụng để đánh giá hiệu quả của sự sản xuất tái tổ hợp của một hoặc nhiều protein Cry theo sáng chế hoặc protein có liên quan, cũng như là để sàng lọc thư viện biểu hiện đối với sự có mặt của trình tự nucleotit mã hóa cho một hoặc nhiều protein Cry theo sáng chế hoặc các trình tự mã hóa cho protein có liên quan. Kháng thể cũng hữu dụng làm phối tử ái lực để tinh chế hoặc phân lập một hoặc nhiều protein bất kỳ theo sáng chế và các protein có liên quan. Protein Cry theo sáng chế và protein có chứa các epitop khác nguyên có liên quan có thể thu được bằng cách biểu hiện quá mức nguyên chiều dài hoặc một phần chiều dài của trình tự mã hóa cho tất cả hoặc một phần của protein Cry theo sáng chế hoặc protein có liên quan trong tế bào chủ được ưu tiên.

Hiểu rằng các trình tự ADN mà mã hóa protein Cry tự nhiên theo sáng chế có thể được thay đổi bằng các phương pháp khác nhau, và các thay đổi này có thể tạo ra các trình tự ADN mã hóa các protein với trình tự axit amin khác với trình tự được mã hóa bởi protein Cry tự nhiên theo sáng chế. Protein Cry có thể được thay đổi theo các cách khác nhau để tạo ra protein Cry đột biến bao gồm sự thế, sự bớt, sự cắt cụt, và sự cài xen axit amin của một hoặc nhiều axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-12, bao gồm lên đến khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, khoảng 8, khoảng 9, khoảng 10, khoảng 15, khoảng 20, khoảng 25, khoảng 30, khoảng 35, khoảng 40, khoảng 45, khoảng 50, khoảng 55, khoảng 60, khoảng 65, khoảng 70, khoảng 75, khoảng 80, khoảng 85, khoảng 90, khoảng 100, khoảng 105, khoảng 110, khoảng 115, khoảng 120, khoảng 125, khoảng 130, khoảng 135, khoảng

140, khoảng 145, khoảng 150, khoảng 155, hoặc nhiều hơn sự thể, sự bớt hoặc sự cài xen axit amin. Phương pháp cho các thao tác này thường được biết trong lĩnh vực. Ví dụ, các biến thể trình tự axit amin của protein Cry tự nhiên có thể được điều chế bằng các đột biến trong polynucleotit mà mã hóa protein. Điều này cũng có thể được thực hiện bằng một trong một vài dạng của sự gây đột biến hoặc trong sự tiến hóa có định hướng. Theo một số khía cạnh, các thay đổi được mã hóa trong trình tự axit amin sẽ cơ bản không ảnh hưởng đến chức năng của protein. Các biến thể này sẽ có hoạt tính diệt côn trùng mong muốn. Theo một số phương án của sáng chế, trình tự nucleotit được thể hiện bởi các SEQ ID NO: 1-3 được biến đổi để đưa vào sự thể axit amin trong protein được mã hóa. Theo phương án khác, protein đột biến thu được được mã hóa bởi polynucleotit đột biến tổng hợp có chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:7-9. Theo các phương án khác, protein đột biến bao gồm, về cơ bản gồm có hoặc gồm có trình tự axit amin được đại diện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:13-15.

Cần hiểu rằng khả năng của protein diệt côn trùng để tạo ra hoạt tính diệt côn trùng có thể được cải thiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật này tùy theo các chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, người ta có thể biểu hiện protein Cry trong tế bào chủ mà thể hiện tỉ lệ kết hợp nhằm bazơ cao trong quá trình sao chép ADN, chẳng hạn như XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Sau khi nhân giống trong các chủng này, có thể phân lập ADN (ví dụ bằng cách điều chế plasmid ADN, hoặc bằng cách khuếch đại bằng kỹ thuật PCR và tách dòng đoạn PCR thu được vào vật truyền), nuôi cấy các đột biến protein Cry trong chủng không đột biến, và xác định gen được đột biến có hoạt tính diệt côn trùng, ví dụ bằng cách thực hiện thử nghiệm để thử nghiệm hoạt tính diệt côn trùng. Thông thường, protein được trộn và được sử dụng trong các thử nghiệm cho ăn. Xem tài liệu, ví dụ Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Các thử nghiệm này có thể bao gồm bước cho thực vật tiếp xúc với một hoặc nhiều loài gây hại và xác định khả năng của thực vật để sống sót hoặc gây chết loài gây hại. Ví dụ về các đột biến mà dẫn đến độc tính tăng lên được tìm thấy trong tài liệu Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Theo cách khác, các thay đổi có thể được tạo ra đối với trình tự axit amin theo sáng chế ở đầu tận cùng amino hoặc carboxy mà về cơ bản không ảnh hưởng đến hoạt tính. Thay đổi này có thể bao gồm sự cài xen, loại bỏ, hoặc các thay đổi được đưa vào

bằng các phương pháp phân tử hiện đại, như PCR, bao gồm khuếch đại PCR mà thay thế hoặc mở rộng trình tự mã hóa protein do đưa vào trình tự mã hóa axit amin trong oligonucleotit được sử dụng trong khuếch đại PCR. Một cách tùy ý, các trình tự protein được thêm có thể bao gồm các trình tự mã hóa protein toàn bộ, như các trình tự thường được sử dụng trong lĩnh vực để tạo ra sự dung hợp protein. Các protein dung hợp này thường được sử dụng để (1) làm tăng biểu hiện của protein quan tâm (2) đưa vào miền liên kết, hoạt tính enzym, hoặc epitop để tạo điều kiện cho hoặc là tinh chế protein, phát hiện protein, hoặc các sử dụng thử nghiệm khác đã biết trong lĩnh vực (3) bài tiết đích hoặc dịch mã protein thành cơ quan dưới mức tế bào, như không gian chu chất của vi khuẩn gam âm, hoặc lưới nội bào của tế bào nhân thực, lưới nội bào thường tạo ra glycosyl hóa protein.

Protein Cry theo sáng chế có thể còn được đột biến để đưa vào một epitop để tạo ra các kháng thể mà nhận diện protein được đột biến. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất protein Cry được đột biến, trong đó thể axit amin trong protein Cry tự nhiên tạo ra protein Cry đột biến có miền kháng nguyên mà cho phép protein Cry đột biến phân biệt với protein Cry tự nhiên trong thử nghiệm phát hiện protein.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể mà nhận diện một cách khác protein Cry được đột biến từ protein Cry tự nhiên mà protein Cry đột biến được dẫn xuất từ đó, phương pháp bao gồm các bước thể các axit amin trong cấu trúc vòng kháng nguyên của protein Cry tự nhiên và làm tăng các kháng thể mà đặc biệt nhận diện cấu trúc vòng kháng nguyên đột biến trong protein Cry đột biến và không nhận diện protein Cry tự nhiên. Theo một phương án, cấu trúc vòng kháng nguyên được xác định trong các miền không bảo toàn bên ngoài miền I của protein Cry tự nhiên. Theo phương án khác, cấu trúc vòng kháng nguyên không phải là cấu trúc vòng liên quan đến nhận diện thụ thể ruột côn trùng của protein Cry hoặc liên quan đến hoạt hóa proteaza của protein Cry.

Các trình tự nucleotit và axit amin biến thể theo sáng chế cũng bao hàm các trình tự được tạo dẫn xuất từ các quy trình gây đột biến và gây tái tổ hợp chẳng hạn như sự xáo trộn ADN. Với quy trình này, một hoặc nhiều vùng mã hóa protein độc khác nhau có thể được dùng để tạo ra protein độc mới sở hữu các đặc điểm mong muốn. Bằng cách này, các thư viện của polynucleotit tái tổ hợp được tạo ra từ quần thể của polynucleotit trình tự liên quan bao gồm các miền trình tự mà có tương đồng trình

tự cơ bản và có thể được tái tổ hợp cùng loại trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể. Ví dụ, bằng cách sử dụng nghiên cứu này, mô típ trình tự mã hóa miền quan tâm có thể được xáo trộn giữa gen của diệt loài gây hại theo sáng chế và gen của diệt loài gây hại đã biết khác để thu được gen mới mã hóa protein với đặc tính quan tâm được cải thiện, như tăng hoạt tính diệt côn trùng. Các chiến lược để xáo trộn ADN này là đã biết trong lĩnh vực. Xem tài liệu, ví dụ, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer et al. (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore et al. (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) *Nature* 391:288-291; và Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,605,793 và 5,837,458.

Sự hoán đổi hoặc xáo trộn miền là cơ chế khác để tạo ra các protein Cry thay đổi theo sáng chế. Các miền có thể được hoán đổi giữa các protein Cry, tạo ra các protein độc lai hoặc khả năng với hoạt tính diệt loài gây hại hoặc phổ đích cải thiện. Phương pháp để tạo ra protein tái tổ hợp và thử nghiệm chúng về hoạt tính diệt loài gây hại đã được biết rõ trong lĩnh vực (xem, ví dụ, Naimov et al. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang et al. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất protein Cry lai có chứa ở đầu tận cùng C, axit amin từ protein Cry thứ nhất theo sáng chế và ở đầu tận cùng N, axit amin từ protein Cry thứ hai theo sáng chế khác với protein Cry thứ nhất theo sáng chế.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, phân tử axit nucleic, băng catxet biểu hiện hoặc gen khả năng theo sáng chế. Theo các phương án khác, vật truyền còn được xác định là plasmid, cosmit, phagemit, nhiễm sắc thể nhân tạo, vật truyền thể thực khuẩn hoặc virus. Một số vật truyền dùng trong biến nạp thực vật và các sinh vật khác là đã biết trong lĩnh vực.

Do đó, một số phương án theo sáng chế đề cập đến băng có thể biểu hiện được thiết kế để biểu hiện polynucleotit và phân tử axit nucleic theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, "băng catxet biểu hiện" nghĩa là phân tử axit nucleic có ít nhất trình tự kiểm soát liên kết có điều khiển với trình tự nucleotit quan tâm. Theo phương thức này, ví dụ, các vùng khởi động thực vật được liên kết có điều khiển với trình tự

nucleotit cần được biểu hiện được cung cấp trong băng catxet biểu hiện để biểu hiện ở cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng.

Băng catxet biểu hiện có chứa polynucleotit được quan tâm có thể là khảm, có nghĩa là ít nhất là một trong số các thành phần của nó là khác loại đối với ít nhất là một trong số các thành phần khác của nó. Băng catxet biểu hiện có thể còn là băng mà có trong tự nhiên nhưng thu được dưới dạng tái tổ hợp hữu dụng cho sự biểu hiện khác loại. Thông thường, tuy nhiên, băng catxet biểu hiện khác loại so với vật chủ, tức là, trình tự axit nucleic cụ thể của băng catxet biểu hiện không có trong tự nhiên trong tế bào chủ và phải đưa vào tế bào chủ hoặc tổ tiên của tế bào chủ bằng sự kiện biến nạp.

Ngoài vùng khởi động liên kết có điều khiển với trình tự nucleotit theo sáng chế, băng catxet biểu hiện theo sáng chế còn có thể bao gồm trình tự điều hòa khác. Như được sử dụng ở đây, "trình tự điều hòa" nghĩa là trình tự nucleotit được bố trí ngược dòng (trình tự không mã hóa 5'), ở trong hoặc xuôi dòng (trình tự không mã hóa 3') của trình tự mã hóa, và mà ảnh hưởng đến sự phiên mã, sự xử lý hoặc tính ổn định ARN, hoặc dịch mã trình tự mã hóa liên quan. Các trình tự điều hòa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gen tăng cường, intron, trình tự dẫn dịch mã, các tín hiệu kết thúc, và trình tự tín hiệu bổ sung polyadenyl.

Theo một số phương án, băng catxet biểu hiện theo sáng chế cũng có thể bao gồm polynucleotit mà mã hóa cho các tính trạng mong muốn khác ngoài protein Cry theo sáng chế. Băng catxet biểu hiện này có chứa các tính trạng xếp chồng có thể được sử dụng để tạo ra cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng có kiểu hình mong muốn với các tính trạng xếp chồng (tức là, sự xếp chồng phân tử). Các dạng kết hợp xếp chồng này ở cây trồng cũng có thể được tạo ra bằng phương pháp khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lai chéo cây trồng bằng phương pháp thông thường bất kỳ. Nếu được chồng lên bằng các cây biến nạp gen, trình tự nucleotit quan tâm có thể kết hợp ở thời điểm và trật tự bất kỳ. Ví dụ, cây trồng chuyển gen chứa một hoặc nhiều đặc điểm mong muốn có thể được sử dụng làm đích để đưa vào các đặc điểm khác bằng biến nạp liên tiếp. Trình tự nucleotit khác có thể được đưa vào một cách đồng thời trong quy trình đồng biến nạp với trình tự nucleotit, phân tử axit nucleic, cấu trúc axit nucleic, hoặc chế phẩm theo sáng chế, được cung cấp bằng dạng kết hợp bất kỳ của các băng catxet biểu hiện. Ví dụ, nếu hai trình tự nucleotit được đưa vào, chúng có thể kết hợp trong các băng riêng rẽ (*trans*) hoặc có thể kết hợp trong cùng băng (*cis*).

Sự biểu hiện của polynucleotit có thể được thực hiện bởi cùng một vùng khởi động hoặc các vùng khởi động khác nhau. Còn nhận thấy rằng polynucleotit có thể được xếp chồng ở vị trí hệ gen mong muốn bằng cách sử dụng hệ tái tổ hợp đặc hiệu vị trí. *Xem, ví dụ, Công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 99/25821; WO 99/25854; WO 99/25840; WO 99/25855 và WO 99/25853.*

Bằng catxet biểu hiện cũng có thể bao gồm trình tự mã hóa khác đối với một hoặc nhiều polypeptit hoặc các phân tử ARN sợi kép (dsARN) được quan tâm đối với các tính trạng nông nghiệp mà chủ yếu là có lợi đối với công ty hạt giống, người trồng hoặc người phát triển hạt. Polypeptit quan tâm có thể là polypeptit bất kỳ được mã hóa bởi trình tự nucleotit mong muốn. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về polypeptit được quan tâm mà thích hợp để sản xuất ở cây trồng bao gồm các polypeptit dẫn đến các tính trạng quan trọng trong nông nghiệp chẳng hạn như tính kháng chất diệt cỏ (đôi khi được đề cập đến dưới dạng "khả năng dung chịu chất diệt cỏ"), tính kháng virus, tính kháng tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, tính kháng côn trùng, tính kháng giun tròn, hoặc tính kháng nấm. *Xem, ví dụ, Sáng chế Mỹ số 5,569,823; 5,304,730; 5,495,071; 6,329,504; và 6,337,431.* Polypeptit còn có thể là nhân tố làm tăng sức sống của cây hoặc sản lượng của cây (bao gồm các đặc điểm cho phép cây phát triển ở các nhiệt độ, điều kiện đất và mức ánh sáng và lượng mưa khác nhau), hoặc nhân tố cho phép xác định cây biểu hiện đặc điểm quan tâm (*ví dụ, chất chỉ thị chọn lọc, màu bao hạt, v.v.*). Các polypeptit quan tâm khác nhau, cũng như phương pháp để đưa các polypeptit này vào cây trồng, được mô tả, ví dụ, trong Sáng chế Mỹ số 4,761,373; 4,769,061; 4,810,648; 4,940,835; 4,975,374; 5,013,659; 5,162,602; 5,276,268; 5,304,730; 5,495,071; 5,554,798; 5,561,236; 5,569,823; 5,767,366; 5,879,903; 5,928,937; 6,084,155; 6,329,504 và 6,337,431; cũng như Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2001/0016956. *Cũng xem, trên website tại địa chỉ lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.*

Polynucleotit tạo ra tính kháng/khả năng chịu chất diệt cỏ ức chế điểm phát triển hoặc mô phân sinh, như imidazalinon hoặc sulfonylure có thể thích hợp theo một số phương án của sáng chế. Polynucleotit ví dụ trong loại này mã hóa đối với enzym ALS và AHAS đột biến như mô tả, ví dụ, trong Sáng chế Mỹ số 5,767,366 và 5,928,937. Sáng chế Mỹ số 4,761,373 và 5,013,659 nhắm đến cây chịu các chất diệt cỏ imidazalinon hoặc sulfonamid. Sáng chế Mỹ số 4,975,374 đề cập đến tế bào của cây và

cây chứa axit nucleic mã hóa glutamin synthetaza (GS) đột biến kháng sự ức chế bởi chất diệt cỏ đã biết là ức chế GS, ví dụ, phosphinothrixin và methionin sulfoximin. Sáng chế Mỹ số 5,162,602 bộc lộ cây kháng sự ức chế bởi chất diệt cỏ xyclohexanedion và aryloxyphenoxypropanoic axit. Sức đề kháng được tạo ra bởi axetyl coenzym A carboxylaza (ACCase) được biến đổi.

Các polypeptit được mã hóa bởi các trình tự nucleotit giúp kháng glyphosat cũng thích hợp với sáng chế. *Xem*, ví dụ, Sáng chế Mỹ số 4,940,835 và Sáng chế Mỹ số 4,769,061. Sáng chế Mỹ số 5,554,798 bộc lộ cây ngô chuyển gen kháng glyphosat, mà sức đề kháng được tạo ra nhờ gen 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimat (EPSP) synthaza biến đổi.

Polynucleotit mã hóa đối với hợp chất kháng phosphono như glufosinat amoni hoặc phosphinothrixin, và pyridinoxy hoặc axit phenoxy propionic và xyclohexon cũng là thích hợp. *Xem*, Công bố đơn Châu Âu 0 242 246. *Cũng xem*, Sáng chế Mỹ số 5,879,903, 5,276,268 và 5,561,236.

Polynucleotit thích hợp khác bao gồm các polynucleotit mã hóa để kháng chất diệt cỏức chế quang hợp, như triazin và benzonitril (nitrilaza) *Xem*, Sáng chế Mỹ số 4,810,648. Polynucleotit thích hợp khác mã hóa cho tính kháng chất diệt cỏ bao gồm các polynucleotit mã hóa cho tính kháng axit 2,2-đicloropropionic, sethoxydim, haloxyfop, chất diệt cỏ imidazolinon, chất diệt cỏ sulfonylure, chất diệt cỏ triazolopyrimidin, chất diệt cỏ s-triazin và bromoxynil. Cũng thích hợp là polynucleotit tạo ra khả năng kháng protox enzym, hoặc mà tạo ra khả năng kháng bệnh thực vật tăng cường; sức chịu các điều kiện môi trường bất lợi tăng cường (các ức chế vô sinh) bao gồm nhưng không giới hạn ở hạn hán, quá lạnh, quá nóng, hoặc độ muối trong đất vượt quá hoặc tính axit hoặc tính kiềm cao; và các thay đổi trong kiến trúc hoặc phát triển của cây trồng, bao gồm các thay đổi về thời gian phát triển. *Xem*, ví dụ, Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2001/0016956 và Sáng chế Mỹ số 6,084,155.

Polynucleotit thích hợp bổ sung bao gồm các polynucleotit mã hóa các polypeptit diệt loài gây hại (ví dụ, diệt côn trùng). Các polypeptit có thể được tạo ra với lượng đủ để kiểm soát, ví dụ, các côn trùng gây hại (ví dụ, lượng kiểm soát côn trùng). Đã nhận ra rằng hàm lượng của sự sản xuất polypeptit diệt loài gây hại ở cây trồng cần để kiểm soát côn trùng hoặc loài gây hại khác có thể thay đổi tùy thuộc vào

cây trồng, kiểu loài gây hại, các yếu tố môi trường và dạng tương tự. Polynucleotit hữu dụng để kháng côn trùng hoặc loài gây hại bổ sung bao gồm, ví dụ, polypeptit mã hóa độc tố được xác định trong sinh vật *Bacillus*. Polynucleotit có chứa trình tự nucleotit mã hóa cho protein Cry *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) từ một vài loài phụ đã được tách dòng và các dòng tái tổ hợp đã được phát hiện là gây độc đối với ấu trùng côn trùng thuộc sâu bọ cánh vảy, sâu bọ hai cánh và bộ cánh cứng. Ví dụ về protein diệt côn trùng *Bt* này bao gồm protein Cry chẳng hạn như *Cry1Aa*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1Ea*, *Cry1Fa*, *Cry3A*, *Cry9A*, *Cry9B*, *Cry9C*, và dạng tương tự, cũng như là protein diệt côn trùng ở thực vật chẳng hạn như *Vip1*, *Vip2*, *Vip3*, và dạng tương tự. Danh sách đầy đủ của protein có nguồn gốc từ *Bt* có thể được tìm thấy trên trang world wide web ở Cơ Sở Dữ Liệu Danh Pháp Độc Tố *Bacillus thuringiensis* được duy trì bởi University of Sussex (cũng xem trong tài liệu, Crickmore *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813).

Polypeptit mà thích hợp để sản xuất ở cây trồng còn bao gồm polypeptit mà cải thiện hoặc theo cách khác làm thuận lợi cho sự biến đổi của cây trồng hoặc phần cây trồng được thu hoạch thành sản phẩm hữu dụng trên thị trường, bao gồm, ví dụ, hàm lượng hoặc sự phân bố carbohydrat tăng lên hoặc được thay đổi, các tính chất lên men được cải thiện, hàm lượng dầu tăng lên, hàm lượng protein tăng lên, khả năng tiêu hóa được cải thiện, và tăng lên hàm lượng thành phần hỗ trợ dinh dưỡng, ví dụ như, hàm lượng phytosterol tăng lên, hàm lượng tocopherol tăng lên, hàm lượng stanol tăng lên hoặc hàm lượng vitamin tăng lên. Các polypeptit quan tâm còn bao gồm, ví dụ, polypeptit tạo ra hoặc góp phần làm giảm hàm lượng thành phần không mong muốn trong mùa vụ thu hoạch, ví dụ, axit phytic, hoặc enzym làm giảm đường. Thuật ngữ "tạo ra" hoặc "góp phần" dùng để chỉ polypeptit quan tâm có thể đóng góp trực tiếp hoặc gián tiếp vào sự tồn tại của đặc điểm quan tâm (ví dụ, làm tăng thoái biến xenluloza bằng cách sử dụng enzym xenlulaza khác loại).

Theo một số phương án, polypeptit góp phần vào khả năng tiêu hóa được cải thiện đối với thực phẩm hoặc thức ăn. Xylanaza là enzym hemixenluloza cải thiện sự hủy hoại thành tế bào của cây, dẫn đến động vật sử dụng tốt hơn dinh dưỡng thực vật. Điều này làm tăng tốc độ phát triển và chuyển hóa thức ăn. Tương tự, độ nhớt của thức ăn chứa xylan có thể giảm. Sản xuất các xylanaza khác loài trong tế bào của cây còn

có thể giúp chuyển hóa lignoxenluloza thành đường lên men được dùng trong sản xuất công nghiệp.

Nhiều xylanaza từ vi sinh vật là nấm và vi khuẩn đã được xác định và được xác định đặc điểm (xem tài liệu, ví dụ như, Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,437,992; Coughlin *et al.* (1993) "Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases" Espoo; Souminen and Reinikainen, eds. (1993) *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research* 8:125-135; Công Bố Bằng Sáng Chế Mỹ Số 2005/0208178; và Công Bố PCT Số WO 03/16654). Cụ thể là, ba xylanaza đặc hiệu (XYL-I, XYL-II, và XYL-III) đã được xác định trong tài liệu *T. reesei* (Tenkanen *et al.* (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14:566; Torronen *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:1461; và Xu *et al.* (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:718).

Theo phương án khác, polypeptit hữu dụng đối với sáng chế có thể là enzym làm thoái hóa polysacarit. Cây theo sáng chế tạo ra enzym này có thể hữu dụng cho tạo ra, ví dụ, thức ăn chăn nuôi lên men để xử lý sinh học. Theo một số phương án, enzym hữu dụng cho quá trình lên men bao gồm alpha amylaza, proteaza, pullulanaza, isoamylaza, xenlulaza, hemixenlulaza, xylanaza, xyclodextrin glycotransferaza, lipaza, phytaza, laccaza, oxidaza, esteraza, cutinaza, enzym thủy phân bột nghiền hạt và glucoamylaza khác.

Enzym làm thoái hóa polysacarit bao gồm: enzym làm thoái hóa tinh bột chẳng hạn như α -amylaza (EC 3.2.1.1), glucuronidaza (E.C. 3.2.1.131); exo-1,4- α -D glucanaza chẳng hạn như amyloglucosidaza và glucoamylaza (EC 3.2.1.3), β -amylaza (EC 3.2.1.2), α -glucosidaza (EC 3.2.1.20), và các exo-amylaza khác; enzym cắt nhánh tinh bột, chẳng hạn như a) isoamylaza (EC 3.2.1.68), pullulanaza (EC 3.2.1.41), và dạng tương tự; b) xenlulaza chẳng hạn như exo-1,4-3-cellobiohydrolaza (EC 3.2.1.91), exo-1,3- β -D-glucanaza (EC 3.2.1.39), β -glucosidaza (EC 3.2.1.21); c) L-arabinaza, chẳng hạn như endo-1,5- α -L-arabinaza (EC 3.2.1.99), α -arabinosidaza (EC 3.2.1.55) và dạng tương tự; d) galactanaza chẳng hạn như endo-1,4- β -D-galactanaza (EC 3.2.1.89), endo-1,3- β -D-galactanaza (EC 3.2.1.90), α -galactosidaza (EC 3.2.1.22), β -galactosidaza (EC 3.2.1.23) và dạng tương tự; e) mannanaza, chẳng hạn như endo-1,4- β -D-mannanaza (EC 3.2.1.78), β -mannosidaza (EC 3.2.1.25), α -mannosidaza (EC

3.2.1.24) và dạng tương tự; f) xylanaza, chẳng hạn như endo-1,4- β -xylanaza (EC 3.2.1.8), β -D-xylosidaza (EC 3.2.1.37), 1,3- β -D-xylanaza, và dạng tương tự; và g) enzym khác chẳng hạn như α -L-fucosidaza (EC 3.2.1.51), α -L-rhamnosidaza (EC 3.2.1.40), levanaza (EC 3.2.1.65), inulanaza (EC 3.2.1.7), và dạng tương tự. Theo một phương án, α -amylaza là α -amylaza tổng hợp, Amy797E, được mô tả trong Bằng Sáng Chế Mỹ Số 8,093,453, được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo toàn bộ.

Các enzym khác mà có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm proteaza, như proteaza nấm và vi khuẩn. Proteaza nấm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, loại thu được từ *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* và *Rhizopus*, như *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* và *M. miehei*. Theo một số phương án, polypeptit theo sáng chế có thể là enzym cellobiohydrolaza (CBH) (EC 3.2.1.91). Theo một phương án, enzym cellobiohydrolaza có thể là CBH1 hoặc CBH2.

Các enzym khác hữu dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hemixenlulaza, như mannaaza và arabinofuranosidaza (EC 3.2.1.55); ligninaza; lipaza (ví dụ, E.C. 3.1.1.3), glucoza oxidaza, pectinaza, xylanaza, transglucosidaza, alpha 1,6 glucosidaza (ví dụ, E.C. 3.2.1.20); esteraza như axit ferulic esteraza (EC 3.1.1.73) và axetyl xylan esteraza (EC 3.1.1.72); và cutinaza (ví dụ E.C. 3.1.1.74).

Các phân tử ARN sợi kép hữu dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở các phân tử ARN sợi kép mà kìm hãm gen côn trùng đích. Như được sử dụng trong bản mô tả này các từ "sự kìm hãm gen", khi dùng cùng nhau, được dự định là dùng để chỉ phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết rõ để làm giảm hàm lượng của protein được tạo ra là kết quả của sự phiên mã gen thành mARN và sự dịch mã tiếp theo của mARN. Sự kìm hãm gen cũng được dự định có nghĩa là sự giảm đi của sự biểu hiện protein từ gen hoặc trình tự mã hóa bao gồm sự kìm hãm gen sau dịch mã và sự kìm hãm phiên mã. Sự kìm hãm gen sau dịch mã được điều hòa qua trung gian sự tương đồng giữa tất cả hoặc một phần của mARN được phiên mã từ gen hoặc trình tự mã hóa được nhắm đích để kìm hãm và ARN sợi kép tương ứng được dùng để kìm hãm, và dùng để chỉ sự giảm đáng kể và có thể đo được của lượng mARN sẵn có trong tế bào để liên kết bởi ribosom. ARN được phiên mã có thể theo hướng có nghĩa để ảnh hưởng đến cái gọi là sự đồng kìm hãm, theo hướng đối nghĩa để ảnh hưởng đến cái gọi là sự kìm hãm đối nghĩa, hoặc theo cả hai hướng tạo ra dsARN để ảnh hưởng

đến cái gọi là sự cản trở ARN (ARNi). Sự kìm hãm phiên mã được điều hòa qua trung gian sự có mặt trong tế bào của dsARN, tác nhân kìm hãm gen, thể hiện độ tương đồng trình tự đáng kể đối với trình tự ADN vùng khởi động hoặc phần bổ sung của chúng để ảnh hưởng đến cái gọi là sự kìm hãm qua vùng khởi động. Sự kìm hãm gen có thể hữu hiệu chống lại gen cây trồng tự nhiên có liên quan đến tính trạng, ví dụ như, để tạo ra cây trồng thực vật có hàm lượng giảm của protein được mã hóa bởi gen tự nhiên này hoặc có hàm lượng được tăng cường hoặc được giảm đi của chất chuyển hóa bị ảnh hưởng. Sự kìm hãm gen cũng có thể hữu hiệu chống lại gen đích ở loài gây hại thực vật mà có thể ăn hoặc tiếp xúc nguyên liệu cây trồng có chứa tác nhân kìm hãm gen, được thiết kế đặc hiệu để ức chế hoặc kìm hãm sự biểu hiện của một hoặc nhiều trình tự tương đồng hoặc trình tự bổ sung trong tế bào của loài gây hại. Gen được nhắm đích để kìm hãm này có thể mã hóa cho protein thiết yếu, chức năng đã được dự đoán mà được chọn từ nhóm gồm có sự tạo thành cơ, sự tạo thành hormon kích sâu non, sự điều hòa hormon kích sâu non, sự điều hòa và vận chuyển ion, sự tổng hợp enzym tiêu hóa, sự duy trì điện thế màng tế bào, sinh tổng hợp axit amin, sự thoái hóa axit amin, sự tạo thành tinh trùng, sự tổng hợp pheromon, sự thụ cảm pheromon, sự tạo thành anten, sự tạo thành cánh, sự tạo thành chân, sự phát triển và sự biệt hóa, sự tạo thành trứng, sự trưởng thành ấu trùng, sự tạo thành enzym tiêu hóa, sự tổng hợp máu (haemolymph), sự duy trì máu (haemolymph), sự dẫn truyền thần kinh, sự phân chia tế bào, sự chuyển hóa năng lượng, sự hô hấp, và sự chết theo chương trình.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào chủ chuyển gen không phải của người chứa polynucleotit, phân tử axit nucleic, gen khảm, băng catxet biểu hiện hoặc vector tái tổ hợp theo sáng chế. Tế bào chủ chuyển gen không phải của người có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào của cây, tế bào nấm men, tế bào vi khuẩn hoặc tế bào côn trùng. Theo đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào vi khuẩn được chọn từ các chi *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Pasteuria*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, hoặc *Alcaligenes*. Do đó, ví dụ, để làm các tác nhân kiểm soát côn trùng sinh học, protein Cry theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách biểu hiện gen khảm mã hóa cho protein Cry theo sáng chế ở tế bào vi

khuẩn. Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất tế bào *Bacillusthuringiensis* có chứa gen khảm theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào cây trồng chuyển gen mà là tế bào cây hai lá mầm hoặc tế bào cây một lá mầm. Theo các phương án bổ sung, tế bào của cây hai lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm tế bào cây đậu tương, tế bào hướng dương, tế bào cây cà chua, tế bào cây cải dầu, tế bào cây bông, tế bào cây củ cải đường và tế bào cây thuốc lá. Theo các phương án khác nữa, tế bào một lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm tế bào cây lúa mạch, tế bào cây ngô, tế bào cây yến mạch, tế bào cây lúa, tế bào cây lúa miến, tế bào cây mía đường và tế bào cây lúa mỳ. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất một số lượng các tế bào hai lá mầm hoặc tế bào một lá mầm biểu hiện protein Cry theo sáng chế mà được mã hóa bởi gen khảm theo sáng chế. Theo các phương án khác nhiều trong số các tế bào được để cạnh để tạo ra con đường vô bào và phát triển dưới ánh sáng mặt trời tự nhiên.

Theo phương án khác theo sáng chế, protein diệt côn trùng Cry theo sáng chế được biểu hiện ở sinh vật bậc cao, ví dụ, thực vật. Trong trường hợp này, cây trồng chuyển gen biểu hiện lượng hữu hiệu của protein diệt côn trùng bảo vệ bản thân chúng khỏi loài gây hại thực vật chẳng hạn như côn trùng gây hại. Khi côn trùng bắt đầu ăn trên cây trồng chuyển gen này, nó ăn protein diệt côn trùng Cry đã được biểu hiện. Điều này có thể ngăn cản côn trùng khỏi hút thêm vào mô cây trồng hoặc có thể còn gây hại hoặc giết côn trùng. Polynucleotit theo sáng chế được chèn vào bằng catxet biểu hiện, mà sau đó được tích hợp ổn định trong hệ gen của cây. Theo phương án khác, polynucleotit được bao gồm trong virus tự sao chép không gây bệnh. Cây được biến nạp theo sáng chế có thể là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bắp (ngô), đậu tương, lúa, lúa mỳ, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, lúa miến, cây kê, hướng dương, cây rum, củ cải đường, bông, mía đường, cây hạt cải dầu, cỏ linh lăng, thuốc lá, lạc, rau, bao gồm, khoai lang, đậu, đậu Hà Lan, rau diếp xoăn, rau diếp, bắp cải, cải hoa, súp lơ, cây củ cải tròn, cà rốt, cà tím, dưa chuột, củ cải, rau bina, khoai tây, cà chua, măng tây, hành, tỏi, dưa, hạt tiêu, cần tây, bí, bí ngô, bí ngòi, quả, bao gồm, táo, lê, mận, anh đào, đào, xuân đào, mơ, dâu tây, nho, mâm xôi, dâu, dưa, bơ, đu đủ, xoài, chuối, và cây chuyên ngành, như *Arabidopsis*, và cây gỗ như cây lá kim và cây lá bản. Tốt hơn là, cây trồng theo sáng chế là cây trồng như ngô, lúa miến, lúa mỳ, hướng dương, cà chua, cây họ cải, hạt tiêu,

khoai tây, bông, lúa, đậu tương, củ cải đường, mía đường, thuốc lá, lúa mạch, cây hạt cải dầu, và tương tự.

Một khi polynucleotit mong muốn được biến nạp vào loài thực vật cụ thể, có thể nhân giống loài này hoặc chuyển thành các dạng khác của loài tương tự, cụ thể là bao gồm các dạng kinh doanh được, sử dụng các kỹ thuật sinh sản truyền thống.

Polynucleotit theo sáng chế được biểu hiện ở cây trồng chuyển gen, do đó gây ra sự sinh tổng hợp của protein Cry tương ứng, ở dạng tiền độc tố hoặc độc tố trưởng thành, trong cây trồng chuyển gen. Bằng cách này, cây trồng chuyển gen có sự bảo vệ năng suất được tăng cường với sự có mặt của áp lực côn trùng được tạo ra. Đối với biểu hiện của chúng trong cây trồng chuyển gen, trình tự nucleotit theo sáng chế có thể cần biến đổi và tối ưu hóa. Mặc dù trong nhiều trường hợp gen vi trùng có thể được biểu hiện ở cây ở các mức cao mà không cần biến đổi, biểu hiện thấp trong cây trồng chuyển gen có thể tạo ra từ trình tự nucleotit của vi khuẩn có bộ ba mã hóa mà không được ưu tiên trong cây trồng. Đã biết trong lĩnh vực rằng các sinh vật sống có các ưu tiên cụ thể đối với việc sử dụng bộ ba mã hóa, và bộ ba mã hóa của các trình tự nucleotit được mô tả trong sáng chế có thể được thay đổi để thích hợp với ưu tiên của cây, trong khi vẫn giữ các axit amin được mã hóa nhờ đó. Hơn nữa, biểu hiện cao ở cây, ví dụ cây ngô, tốt nhất thu được từ các trình tự mã hóa mà có hàm lượng GC ít nhất khoảng 35%, hoặc ít nhất khoảng 45%, hoặc ít nhất khoảng 50%, hoặc ít nhất khoảng 60%. Trình tự nucleotit của vi khuẩn mà có hàm lượng GC thấp có thể biểu hiện nghèo nàn ở cây do sự tồn tại của mô típ ATTTA mà có thể làm bất ổn định các thông tin, và các mô típ AATAAA mà có thể tạo ra sự polyadenyl hóa không thích hợp. Mặc dù một số các trình tự gen nhất định có thể được biểu hiện một cách thích hợp trong cả các loài cây một lá mầm và hai lá mầm, các trình tự có thể được biến đổi để tính cho các ưu tiên bộ ba mã hóa cụ thể và ưu tiên hàm lượng GC của cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm như các ưu tiên này đã được thể hiện để phân biệt (Murray *et al.* Nucl. Acids Res. 17:477-498 (1989)). Ngoài ra, trình tự nucleotit được sàng lọc đối với sự tồn tại của các vị trí nối không hợp lệ mà có thể gây ra cắt cụt thông tin. Tất cả các thay đổi cần được thực hiện trong các trình tự nucleotit như các trình tự được mô tả ở trên được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết về gây đột biến hướng điếm, PCR, và xây dựng gen tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả ví dụ trong Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,625,136; 5,500,365 và 6,013,523.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các trình tự hoặc polynucleotit mã hóa tổng hợp được tạo ra theo quy trình được bộc lộ trong Bảng Sáng Chế Mỹ số 5,625,136, được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Trong quy trình này, bộ ba mã hóa được ưu tiên của ngô, tức là, bộ ba mã hóa đơn mà mã hóa thường xuyên nhất axit amin ở ngô, được sử dụng. Bộ ba mã hóa được ưu tiên của ngô cho axit amin cụ thể có thể được dẫn xuất, ví dụ, từ các trình tự gen đã biết từ ngô. Ví dụ, việc sử dụng bộ ba mã hóa của ngô cho 28 gen từ cây ngô được tìm thấy trong Murray *et al.*, Nucleic Acids Research 17:477-498 (1989), nội dung của nó được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn. Trình tự tổng hợp được lấy làm ví dụ đặc biệt theo sáng chế được thực hiện với được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của ngô được đại diện bởi trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 4-9. Đã nhận ra rằng các được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở một loài thực vật cũng sẽ có chức năng ở loài thực vật khác nhưng có thể không ở cùng mức độ như loài thực vật mà các bộ ba mã hóa đã được tối ưu hóa cho nó. Theo cách này, trình tự nucleotit có thể được tối ưu để biểu hiện ở cây bất kỳ. Hiểu rằng tất cả hoặc một phần bất kỳ của trình tự nucleotit có thể được tối ưu hóa hoặc tổng hợp. Tức là, polynucleotit có thể có chứa trình tự nucleotit mà là trình tự tự nhiên một phần và trình tự được tối ưu hóa bộ ba mã hóa một phần.

Để khởi đầu dịch mã hiệu quả, các trình tự liên kề với methionin có thể cần biến đổi. Ví dụ, chúng có thể được biến đổi bằng cách gộp vào các trình tự đã biết là có hiệu quả trong thực vật. Joshi đã đề xuất trình tự liên ứng thích hợp đối với thực vật (NAR 15:6643-6653 (1987)) và Clonotech đề xuất chất khởi đầu dịch mã liên ứng khác (danh mục 1993/1994, trang 210). Các trình tự liên ứng này thích hợp để dùng với các trình tự nucleotit theo sáng chế. Các trình tự được kết hợp vào các cấu trúc bao gồm trình tự nucleotit, lên đến và bao gồm ATG (trong khi bỏ axit amin thứ hai không được biến đổi), hoặc tùy ý lên đến và bao gồm GTC sau ATG (với khả năng thay đổi axit amin thứ hai của gen chuyển).

Các trình tự mã hóa cho protein Cry mới theo sáng chế, dưới dạng trình tự tự nhiên của chúng hoặc dưới dạng trình tự tổng hợp như được mô tả ở trên, có thể được dung hợp có điều khiển với nhiều vùng khởi động để biểu hiện ở thực vật bao gồm các vùng khởi động cấu trúc, cảm ứng, được điều hòa tạm thời, được điều hòa tiến triển, được điều hòa hóa học, ưu tiên mô và đặc hiệu mô để điều chế phân tử ADN tái tổ hợp, tức là, gen khảm. Việc lựa chọn vùng khởi động sẽ thay đổi tùy thuộc vào yêu

cầu thời gian và không gian, và còn tùy thuộc vào loài đích. Do đó, sự biểu hiện của trình tự nucleotit theo sáng chế ở lá, ở cuống hoặc thân, ở bông, ở cụm hoa (ví dụ như chùm, chùy, lõi, v.v.), ở rễ, hoặc cây con được ưu tiên. Trong nhiều trường hợp, tuy nhiên, đòi hỏi bảo vệ chống lại nhiều hơn một loại côn trùng gây hại, và do đó biểu hiện trong nhiều mô là cần thiết. Mặc dù nhiều vùng khởi động từ các cây hai lá mầm đã thể hiện hoạt động trong các cây một lá mầm và ngược lại, lý tưởng là các vùng khởi động của cây hai lá mầm được chọn để biểu hiện trong cây hai lá mầm và các vùng khởi động của cây một lá mầm để biểu hiện trong cây một lá mầm. Tuy nhiên, không có hạn chế đối với nguồn gốc của vùng khởi động được chọn; chỉ cần chúng hoạt động trong việc dẫn hướng biểu hiện của trình tự nucleotit trong tế bào mong muốn.

Các vùng khởi động cấu trúc thích hợp bao gồm, ví dụ, vùng khởi động CaMV 35S (SEQ ID NO:1546; Odell et al., Nature 313:810-812, 1985); vùng khởi động Arabidopsis At6669 (SEQ ID NO:1652; xem Công Bố PCT Số W004081173A2); Ubi 1 ở ngô (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18:675-689, 1992); actin ở lúa (McElroy et al., Plant Cell 2:163-171, 1990); pEMU (Last et al., Theor. Appl. Genet. 81:581-588, 1991); CaMV 19S (Nilsson et al., Physiol. Plant 100:456-462, 1997); GOS2 (de Pater et al., Plant J November; 2(6):837-44, 1992); ubiquitin (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992); xyclophilin ở lúa (Bucholz et al., Plant Mol Biol. 25(5):837-43, 1994); histon H3 ngô (Lepetit et al., Mol. Gen. Genet. 231: 276-285, 1992); Actin 2 (An et al., Plant J. 10(1):107-121, 1996), vùng khởi động CT2 đỉnh rễ cấu trúc (SEQ ID NO:1535; cũng xem Công bố PCT Số IL/2005/000627) và Super MAS Tổng hợp (Ni et al., The Plant Journal 7: 661-76, 1995). Các vùng khởi động cấu trúc khác bao gồm các vùng khởi động trong Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,659,026, 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; và 5,608,142.Molec. Biol.

Vùng khởi động đặc hiệu mô hoặc ưu tiên mô hữu dụng để biểu hiện trình tự mã hóa protein *cry* mới theo sáng chế ở cây trồng, cụ thể là ngô, là các loại mà định hướng sự biểu hiện ở rễ, ruột cây, lá hoặc phần hoa. Các vùng khởi động đặc hiệu mô thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các vùng khởi động đặc hiệu lá [chẳng hạn như được mô tả, ví dụ, bởi Yamamoto et al., Plant J. 12:255-265, 1997; Kwon et al., Plant Physiol. 105:357-67, 1994; Yamamoto et al., Plant Cell Physiol. 35:773-778,

1994; Gotor et al., Plant J. 3:509-18, 1993; Orozco et al., Plant Mol. Biol. 23:1129-1138, 1993; và Matsuoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9586-9590, 1993], các vùng khởi động ưu tiên hạt [ví dụ như, từ gen đặc hiệu hạt (Simon, et al., Plant Mol. Biol. 5. 191, 1985; Scofield, et al., J. Biol. Chem. 262: 12202, 1987; Baszczynski, et al., Plant Mol. Biol. 14: 633, 1990), Brazil Nut albumin (Pearson' et al., Plant Mol. Biol. 18: 235-245, 1992), legumin (Ellis, et al. Plant Mol. Biol. 10: 203-214, 1988), Glutelin (*rice*) (Takaiwa, et al., Mol. Gen. Genet. 208: 15-22, 1986; Takaiwa, et al., FEBS Letts. 221: 43-47, 1987), Zein (Matzke et al., Plant Mol Biol, 143).323-32 1990), napA (Stalberg, et al., Planta 199: 515-519, 1996), SPA Lúa mỳ (Albanietal, Plant Cell, 9: 171-184, 1997), oleosin hướng dương (Cummins, etal., Plant Mol. Biol. 19: 873-876, 1992)], các vùng khởi động đặc hiệu nội nhũ [ví dụ như, LMW và HMW lúa mỳ, glutenin-1 (Mol Gen Genet 216:81-90, 1989; NAR 17:461-2), a, b và g gliadin lúa mỳ (EMB03:1409-15, 1984), vùng khởi động ltrl lúa mạch, B1, C, D hordein lúa mạch (Theor Appl Gen 98:1253-62, 1999; Plant J 4:343-55, 1993; Mol Gen Genet 250:750-60, 1996), Barley DOF (Mena et al., The Plant Journal, 116(1): 53-62, 1998), Biz2 (EP99106056.7), Vùng khởi động tổng hợp (Vicente-Carbajosa et al., Plant J. 13: 629-640, 1998), prolamin NRP33 lúa, globulin lúa Glb-1 (Wu et al., Plant Cell Physiology 39(8) 885-889, 1998), alpha-globulin lúa REB/OHP-1 (Nakase et al. Plant Mol. Biol. 33: 513-S22, 1997), ADP-glucoza PP lúa (Trans Res 6:157-68, 1997), họ gen ESR ngô (Plant J 12:235-46, 1997), gamma-kafirin lúa miến (Plant Mol. Biol 32:1029-35, 1996)], các vùng khởi động đặc hiệu phôi [ví dụ như, OSH1 lúa (Sato et al., Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 93: 8117-8122), KNOX (Postma-Haarsma of al, Plant Mol. Biol. 39:257-71, 1999), oleosin lúa (Wu et at, J. Biochem., 123:386, 1998)], các vùng khởi động đặc hiệu hoa [ví dụ như, AtPRP4, chalene syntaza (chsA) (Van der Meer, et al., Plant Mol. Biol. 15, 95-109, 1990), LAT52 (Twell et al., Mol. Gen Genet. 217:240-245; 1989), apetala-3, mô sinh sản thực vật [ví dụ như, các vùng khởi động OsMADS (Đơn Sáng Chế Mỹ 2007/0006344)].

Trình tự nucleotit theo sáng chế còn có thể được biểu hiện dưới sự điều biến của vùng khởi động mà là điều biến hóa học. Điều này cho phép các protein Cry theo sáng chế được tổng hợp chỉ khi cây trồng được xử lý bằng các chất hóa học cảm ứng. Các ví dụ của công nghệ cảm ứng hóa học của biểu hiện gen này được mô tả chi tiết

trong công bố đơn EP 0 332 104 và Sáng chế Mỹ số 5,614,395. Theo một phương án, vùng khởi động điều biến hóa học là vùng khởi động PR-1a của thuốc lá.

Nhóm vùng khởi động khác hữu dụng theo sáng chế là loại mà cảm ứng cuộn. Nhiều vùng khởi động đã được mô tả mà được biểu hiện tại vị trí cuộn và cả ở các vị trí nhiễm bệnh thực vật. Lý tưởng là, vùng khởi động này chỉ có thể có hoạt tính cục bộ tại vị trí côn trùng xâm chiếm, và bằng cách này protein diệt côn trùng chỉ xếp chồng trong các tế bào cần tổng hợp protein diệt côn trùng để diệt loài côn trùng gây hại xâm chiếm. Ví dụ về các vùng khởi động thuộc loại này bao gồm các vùng khởi động được mô tả bởi Stanford *et al.* Mol. Gen. Genet. 215:200-208 (1989), Xu *et al.* Plant Molec. Biol. 22:573-588 (1993), Logemann *et al.* Plant Cell 1:151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, Plant Molec. Biol. 22:783-792 (1993), Firek *et al.* Plant Molec. Biol. 22:129-142 (1993), và Warner *et al.* Plant J. 3:191-201 (1993).

Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về các vùng khởi động mà tạo ra các mẫu biểu hiện đặc hiệu mô mà hữu dụng trong sáng chế bao gồm đặc hiệu mô màu xanh, đặc hiệu rễ, đặc hiệu thân, hoặc đặc hiệu hoa. Các vùng khởi động thích hợp để biểu hiện trong mô màu xanh bao gồm nhiều gen điều chỉnh liên quan đến quang tổng hợp và nhiều vùng khởi động được nhân bản từ cả hai loại cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Một vùng khởi động như vậy là vùng khởi động PEPC ở ngô từ gen phosphoenol carboxylaza (Hudspeth & Grula, Plant Molec. Biol. 12:579-589 (1989)). Vùng khởi động khác để biểu hiện đặc hiệu rễ là loại được mô tả bởi de Framond (FEBS 290:103-106 (1991) hoặc Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,466,785). Vùng khởi động khác hữu dụng theo sáng chế là vùng khởi động đặc hiệu thân được mô tả trong Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,625,136, mà dẫn hướng một cách tự nhiên sự biểu hiện của gen *trpA* của ngô.

Bên cạnh việc lựa chọn vùng khởi động thích hợp, các cấu trúc để biểu hiện độc tố diệt côn trùng ở cây trồng cần trình tự kết thúc phiên mã thích hợp để liên kết có điều khiển xuôi dòng của trình tự nucleotit khác loại. Một số trình tự kết thúc là đã có và là đã biết trong lĩnh vực (ví dụ tml từ CaMV, E9 từ rbcS). Trình tự kết thúc bất kỳ hiện có đã biết là có chức năng trong thực vật có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế.

Nhiều trình tự khác có thể được kết hợp vào băng có thể biểu hiện mô tả trong sáng chế. Các trình tự này bao gồm các trình tự thể hiện tăng cường biểu hiện như các trình tự intron (ví dụ từ *Adhl* và *bronzel*) và trình tự dẫn dắt vi rút (ví dụ từ TMV, MCMV và AMV).

Có thể ưu tiên là nhắm đích biểu hiện trình tự nucleotit theo sáng chế đến định vị tế bào khác nhau trong cây trồng. Trong một số trường hợp, sự định vị trong xytosol có thể mong muốn, trong khi đó trong các trường hợp khác, sự định vị trong một số hạt cơ quan dưới mức tế bào có thể được ưu tiên. Cơ chế bất kỳ để nhắm đích sản phẩm gen, ví dụ, ở cây, có thể được dùng để thực hiện sáng chế, và các cơ chế này được biết là tồn tại ở cây và các trình tự kiểm soát chức năng của các cơ chế này đã được mô tả cụ thể ở mức nào đó. Các trình tự này đã được xác định đặc điểm mà gây ra sự nhắm đích của sản phẩm gen vào các khoang tế bào khác. Các trình tự đầu tận cùng amino có thể chịu trách nhiệm đối với việc nhắm đích protein được quan tâm vào khoang tế bào bất kỳ, chẳng hạn như, không bào, ty thể, peroxisom, thể protein, lưới nội chất, lục lạp, hạt tinh bột, lạp bột, con đường vô bào hoặc thành tế bào của thực vật (ví dụ như Unger et. al. *Plant Molec. Biol.* 13: 411-418 (1989); Rogers et. al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6512-651; Bằng Sáng Chế Mỹ Số 7,102,057; WO 2005/096704, tất cả chúng được kết hợp tại đây bằng cách viện dẫn. Một cách tùy ý, trình tự tín hiệu có thể là trình tự tín hiệu đầu tận cùng N từ sáp, trình tự tín hiệu đầu tận cùng N từ gamma-zein, miền liên kết tinh bột, miền liên kết tinh bột đầu tận cùng C, trình tự nhắm đích lục lạp, mà nhập protein trưởng thành vào lục lạp (Comai et. al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 15104-15109; van den Broeck, et. al. (1985) *Nature* 313: 358-363; Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,639,949) hoặc trình tự tín hiệu tiết từ tế bào aloron (Koehler & Ho, *Plant Cell* 2: 769-783 (1990)). Ngoài ra, các trình tự đầu tận cùng amino kết hợp với các trình tự đầu tận cùng carboxy chịu trách nhiệm đối với việc nhắm đích không bào của sản phẩm gen (Shinshi et. al. (1990) *Plant Molec. Biol.* 14: 357-368). Theo một phương án, trình tự tín hiệu được chọn bao gồm điểm phân cắt đã biết, và dung hợp được cấu trúc xét đến các axit amin bất kỳ sau (các) vị trí phân cắt mà cần cho phân cắt. Trong một số trường hợp yêu cầu này có thể được thỏa mãn bằng cách bổ sung số lượng nhỏ các axit amin giữa vị trí phân cắt và ATG gen chuyển hoặc, tùy ý, thay đổi vị trí của một số axit amin trong trình tự gen chuyển. Kỹ thuật cấu trúc

này là đã biết trong lĩnh vực và có thể áp dụng tương đương cho các ngăn tế bào bất kỳ.

Sẽ hiểu rằng các cơ chế được mô tả ở trên để nhắm đích tế bào có thể được sử dụng không chỉ cùng với vùng khởi động cùng nguồn của chúng, mà còn cùng với vùng khởi động khác loại sao cho ảnh hưởng đến mục tiêu nhắm đích tế bào cụ thể dưới sự điều biến phiên mã của vùng khởi động mà có mẫu biểu hiện khác của vùng khởi động từ đó tạo ra tín hiệu nhắm đích.

Biến nạp cây trồng

Quy trình để biến nạp cây trồng là đã biết và quen thuộc trong lĩnh vực và được mô tả qua các tài liệu tham khảo. Ví dụ không làm giới hạn sáng chế về phương pháp để biến nạp cây trồng bao gồm sự biến nạp thông qua sự chuyển axit nucleic qua trung gian vi khuẩn (ví dụ, thông qua *Agrobacterium*), sự chuyển axit nucleic qua trung gian virus, sự chuyển axit nucleic qua trung gian sợi tinh thể silic cacbua hoặc axit nucleic, sự chuyển axit nucleic qua trung gian liposom, vi tiêm, bắn vi hạt, sự biến nạp qua trung gian canxi-phosphat, sự biến nạp qua trung gian xyclodextrin, đục lỗ điện, sự biến nạp qua trung gian hạt nano, siêu âm, sự thâm nhiễm, sự hấp thụ axit nucleic qua trung gian PEG, cũng như là các cơ chế điện, hóa, lý (cơ học) hoặc sinh học khác bất kỳ mà gây ra sự đưa axit nucleic vào trong tế bào cây trồng, bao gồm dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các hướng dẫn chung về các phương pháp biến nạp cây khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này bao gồm Miki *et al.* ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pages 67-88) và Rakowoczy-Trojanowska (*Cell. Mol. Biol. Lett.* 7:849-858 (2002)).

Đối với sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, các vật truyền hai kỳ hoặc vật truyền mang ít nhất một trình tự viền T-ADN thích hợp, trong khi đó đối với chuyển gen trực tiếp (ví dụ, bắn hạt và dạng tương tự) vật truyền bất kỳ là thích hợp và ADN thẳng chỉ chứa cấu trúc quan tâm có thể được sử dụng. Trong trường hợp chuyển gen trực tiếp, biến nạp với các loại ADN đơn hoặc đồng biến nạp có thể được sử dụng (Schocher *et al.*, *Biotechnology* 4:1093- 1096 (1986)). Đối với cả chuyển gen trực tiếp và chuyển trung gian *Agrobacterium*, biến nạp thường (nhưng không nhất thiết) được

hấp thu với chất chỉ thị chọn lọc có thể là lựa chọn dương (Phosphomanoza Isomeraza), tạo ra khả năng kháng kháng sinh (kanamycin, hygromycin hoặc methotrexat) hoặc chất diệt cỏ (glyphosat hoặc glufosinat). Tuy nhiên, việc lựa chọn chất chỉ thị chọn lọc không thuộc phạm vi sáng chế.

Sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* là phương pháp thường được sử dụng để biến nạp thực vật bởi vì hiệu quả biến nạp cao của nó và bởi vì khả năng sử dụng rộng của nó với nhiều loài khác nhau. Sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* thường gồm có sự chuyển của vật truyền nhị thể mang ADN ngoại lai được quan tâm vào chủng *Agrobacterium* thích hợp mà có thể phụ thuộc vào phần bổ sung của gen *vir* được mang bởi chủng vật chủ *Agrobacterium* trên plasmid Ti cư trú hoặc trên nhiễm sắc thể (Uknes *et al.* (1993) *Plant Cell* 5:159-169). Việc chuyển vật truyền nhị thể tái tổ hợp vào *Agrobacterium* có thể được thực hiện bằng quy trình giao phối ba bên sử dụng *Escherichia coli* mang vật truyền nhị thể tái tổ hợp, chủng *E. coli* hỗ trợ mang plasmid mà có khả năng di chuyển vật truyền nhị thể tái tổ hợp đến chủng *Agrobacterium* đích. Theo cách khác, vật truyền nhị thể tái tổ hợp có thể được chuyển vào *Agrobacterium* bằng cách biến nạp axit nucleic (Höfgen & Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

Cây hai lá mầm cũng như là cây một lá mầm có thể được biến nạp bằng cách sử dụng *Agrobacterium*. Phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* ở lúa bao gồm các phương pháp đã biết để biến nạp lúa, chẳng hạn như các phương pháp được mô tả trong tài liệu bất kỳ trong số các tài liệu sau: đơn sáng chế châu Âu EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan *et al.* (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-506, 1993), Hiei *et al.* (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), mà bản bộ lọc được kết hợp ở đây để tham khảo như thể được nêu đầy đủ. Trong trường hợp biến nạp ngô, phương pháp được ưu tiên là phương pháp như được mô tả trong tài liệu Ishida *et al.* (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996) hoặc Frame *et al.* (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), mà bản bộ lọc được kết hợp ở đây để tham khảo như thể được nêu đầy đủ. Phương pháp này được mô tả thêm bằng cách lấy ví dụ trong tài liệu B. Jenes *et al.*, *Techniques for Gene Transfer*, trong: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 và trong tài liệu Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Axit nucleic hoặc cấu trúc cần được biểu hiện tốt hơn là được tách dòng vào

vật truyền, mà thích hợp để biến nạp *Agrobacterium tumefaciens*, ví dụ pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). *Agrobacteria* được biến nạp bằng vật truyền này sau đó có thể được sử dụng theo phương thức đã biết để biến nạp thực vật, chẳng hạn như thực vật dùng làm mẫu, như *Arabidopsis* hoặc cây trồng chẳng hạn như, bằng cách lấy làm ví dụ, cây thuốc lá, ví dụ bằng cách nhúng lá đã nghiền thô hoặc lá đã băm trong dung dịch *agrobacteria* và sau đó nuôi cây chúng trong môi trường thích hợp. Sự biến nạp của thực vật bằng phương thức *Agrobacterium tumefaciens* được mô tả, ví dụ, bởi Hagen và Willmitzer trong tài liệu Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 hoặc đã biết không kể những cái khác từ F. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; trong tài liệu Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

Biến nạp của cây bằng *Agrobacterium* tái tổ hợp thường liên quan đến nuôi cấy đồng thời *Agrobacterium* với các cây mô từ cây trồng và theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực. Mô biến nạp được tạo ra trong môi trường chọn lọc mang chất kháng sinh hoặc dầu kháng thuốc diệt cỏ giữa các viên T-ADN lặp thể hai kỳ.

Như được bàn đến ở trên, phương pháp khác để biến nạp cây, bộ phận của cây và tế bào của cây liên quan đến việc đẩy các hạt hoạt tính sinh học hoặc tro ở mô và tế bào cây. Xem, ví dụ, Bằng Sáng Chế Mỹ số 4,945,050; 5,036,006 và 5,100,792. Thông thường, phương pháp liên quan đến việc đẩy các hạt hoạt tính sinh học hoặc tro ở tế bào của cây dưới các điều kiện hiệu quả để xâm nhập mặt ngoài của tế bào và tạo ra kết hợp bên trong nó. Khi các hạt tro được sử dụng, vật truyền có thể được đưa vào tế bào bằng cách phủ các hạt bằng các vật truyền chứa axit nucleic quan tâm. Tùy ý, tế bào hoặc thể bào có thể bao quanh bởi vật truyền mà vật truyền được mang vào tế bào bằng cách theo hạt. Các hạt hoạt tính sinh học (ví dụ, tế bào nấm men khô, vi khuẩn khô hoặc vật ăn vi khuẩn, mỗi hạt chứa một hoặc nhiều axit nucleic cần đưa vào) còn có thể được đẩy vào mô cây trồng.

Theo phương án khác, polynucleotit theo sáng chế có thể được biến nạp trực tiếp vào hệ gen lặp thể. Lợi ích chủ yếu của biến nạp lặp thể là các lặp thể thường có khả năng biểu hiện gen vi khuẩn mà không làm biến đổi cơ bản, và các lặp thể có khả năng biểu hiện khung đọc mở phức dưới sự kiểm soát của vùng khởi động đơn. Công nghệ biến nạp lặp thể được mô tả bao quát trong Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,451,513, 5,545,817, và 5,545,818, trong Công bố PCT Số WO 95/16783, và trong McBride et

al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7301-7305. Kỹ thuật cơ sở để biến nạp lập lục liên quan đến việc đưa các miền ADN lập thể đã tách dòng giới hạn hai đầu một chất chỉ thị chọn lọc cùng với gen quan tâm vào mô đích thích hợp, ví dụ, dùng súng bắn gen hoặc biến nạp tế bào trần (như biến nạp qua trung gian canxi clorua hoặc PEG). Các miền giới hạn hai đầu 1-1,5kb, được gọi là các trình tự đích, tạo điều kiện cho tái tổ hợp tương đồng với hệ gen lập thể và do đó cho phép thay thế hoặc sửa đổi các miền cụ thể của hệ gen lập thể. Ban đầu, các đột biến điểm trong các gen rARN và rps12 16S lục lập mang lại tính kháng đối với spectinomycin hoặc streptomycin có thể được sử dụng làm chất chỉ thị chọn lọc để biến nạp (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8526-8530; Staub, J. M., and Maliga, P. (1992) *Plant Cell* 4, 39-45). Sự có mặt các vị trí tách dòng giữa các chỉ thị này cho phép tạo ra vật truyền định hướng lập thể để đưa vào các gen lạ (Staub, J.M., and Maliga, P. (1993) *EMBO J.* 12, 601-606). Sự tăng lên đáng kể ở tần số biến nạp có thể đạt được bằng cách thay thế gen kháng kháng sinh rARN hoặc r-protein lặn bằng chất chỉ thị chọn lọc trội, gen aadA vi khuẩn mã hóa cho enzym khử độc spectinomycin aminoglycosit- 3'- adenyltransferaza (Svab, Z., and Maliga, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 913-917). Trước đây, chỉ thị này được sử dụng thành công để biến nạp tần suất cao của hệ gen lập thể của tảo xanh *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:4083-4089). Các chất chỉ thị chọn lọc khác hữu dụng cho biến nạp lập thể đã được biết trong lĩnh vực và bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Thông thường, cần đến khoảng 15-20 chu kỳ phân chia tế bào sau khi biến nạp để đạt được trạng thái đồng nhất. Biểu hiện lập thể, mà trong đó các gen được chèn bởi tái tổ hợp tương đồng vào toàn bộ vài nghìn bản sao của hệ gen lập thể vòng có trong mỗi tế bào của cây, lợi dụng số lượng rất lớn bản sao lợi thế hơn các gen được biểu hiện trong nhân để cho phép các mức biểu hiện có thể dễ dàng vượt quá 10% tổng protein ở cây trồng hoà tan. Theo một phương án, polynucleotit theo sáng chế có thể được chèn vào vật truyền định hướng lập thể và được biến nạp vào hệ gen lập thể của vật chủ thực vật mong muốn. Do đó, thực vật đồng nhất đối với các hệ gen lập thể chứa trình tự nucleotit của sáng chế có thể thu được, mà có khả năng biểu hiện cao polynucleotit.

Phương pháp chọn lọc đối với cây trồng, tế bào cây trồng hoặc môi trường nuôi cấy mô cây trồng được biến nạp, chuyển gen là thông thường trong lĩnh vực và có

thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, vector tái tổ hợp theo sáng chế cũng có thể bao gồm băng catxet biểu hiện có chứa trình tự nucleotit đối với chất chỉ thị chọn lọc, mà có thể được sử dụng để chọn lọc cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng được biến nạp. Như được dùng trong bản mô tả này, "chất chỉ thị chọn lọc" có nghĩa là trình tự nucleotit mà khi được biểu hiện truyền kiểu hình khác biệt cho cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng biểu hiện chất chỉ thị và do đó cho phép cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng được biến nạp này được phân biệt với cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng mà không có chất chỉ thị. Trình tự nucleotit có thể mã hóa hoặc là chất chỉ thị chọn lọc hoặc sàng lọc, phụ thuộc và chỉ dấu tạo ra đặc điểm có thể được chọn lọc bằng phương pháp hóa học, như bằng cách sử dụng chất chọn lọc (ví dụ, chất kháng sinh, chất diệt cỏ, hoặc tương tự), hoặc liệu chỉ dấu đơn giản là đặc điểm mà có thể xác định thông qua việc quan sát hoặc thử, như bằng cách sàng lọc (ví dụ, đặc điểm nơi cư trú R). Đương nhiên, nhiều ví dụ về chất chỉ thị chọn lọc thích hợp là đã biết trong lĩnh vực và có thể được sử dụng trong băng có thể biểu hiện mô tả ở đây.

Ví dụ về chất chỉ thị chọn lọc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự nucleotit mã hóa cho *neo* hoặc *nptII*, mà mang lại tính kháng đối với kanamycin, G418, và dạng tương tự (Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188); trình tự nucleotit mã hóa cho *bar*, mà mang lại tính kháng đối với phosphinothrixin; trình tự nucleotit mã hóa cho 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat (EPSP) syntaza được thay đổi, mà mang lại tính kháng đối với glyphosat (Hinchee *et al.* (1988) *Biotech.* 6:915-922); trình tự nucleotit mã hóa cho nitrilaza chẳng hạn như *bxn* từ *Klebsiella ozaenae* mà mang lại tính kháng đối với bromoxynil (Stalker *et al.* (1988) *Science* 242:419-423); trình tự nucleotit mã hóa cho axetolactat syntaza (ALS) được thay đổi mà mang lại tính kháng đối với imidazolinon, sulfonylure hoặc hóa chất ức chế ALS khác (Đơn Sáng Chế EP Số 154204); trình tự nucleotit mã hóa cho dihydrofolat reductaza (DHFR) kháng methotrexat (Thillet *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508); trình tự nucleotit mã hóa cho dalapon dehalogenaza mà mang lại tính kháng đối với dalapon; trình tự nucleotit mã hóa cho mannoza-6-phosphat isomeraza (còn được gọi là phosphomannoza isomeraza (PMI)) mà mang lại khả năng chuyển hóa mannoza (Bằng Sáng Chế Mỹ Số 5,767,378 và 5,994,629); trình tự nucleotit mã hóa cho anthranilat syntaza được thay đổi mà mang lại tính kháng đối với 5-metyl tryptophan; hoặc trình

tự nucleotit mã hóa cho *hph* mà mang lại tính kháng đối với hygromyxin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có khả năng chọn chất chỉ thị chọn lọc thích hợp để dùng trong băng catxet biểu hiện của sáng chế.

Các chất chỉ thị chọn lọc bổ sung bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trình tự nucleotit mã hóa β -glucuronidaza hoặc *uidA* (GUS) mà mã hóa enzym mà các nền chất sinh màu khác nhau cho chúng là đã biết; trình tự nucleotit điểm R mà mã hóa sản phẩm mà điều biến việc tạo ra chất nhuộm anthoxyanin (màu đỏ) trong mô cây trồng (Dellaporta *et al.*, "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac" 263-282 trong: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press 1988)); trình tự nucleotit mã hóa cho β -lactamaza, enzym mà các chất nền sinh màu khác nhau đối với chúng đã được biết đến (ví dụ như, PADAC, xephalosporin sinh màu) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-3741); trình tự nucleotit mã hóa cho *xyle* mà mã hóa cho catechol dioxygenaza (Zukowsky *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1101-1105); trình tự nucleotit mã hóa cho tyrosinaza, enzym có khả năng oxy hóa tyrosin thành DOPA và dopaquinon, mà đến lượt nó ngưng tụ để tạo thành melanin (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714); trình tự nucleotit mã hóa cho β -galactosidaza, enzym mà có các chất nền sinh màu đối với nó; trình tự nucleotit mã hóa cho luxiferaza (*lux*) mà cho phép phát hiện sự phát quang sinh học (Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-859); trình tự nucleotit mã hóa cho aequorin mà có thể được sử dụng trong sự phát hiện phát quang sinh học nhạy cảm với canxi (Prasher *et al.* (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126:1259-1268); hoặc trình tự nucleotit mã hóa cho protein huỳnh quang màu xanh lá (Niedz *et al.* (1995) *Plant Cell Reports* 14:403-406). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có khả năng chọn chất chỉ thị chọn lọc thích hợp để dùng trong băng catxet biểu hiện của sáng chế.

Ngoài ra, như đã biết rõ trong lĩnh vực, cây trồng chuyển gen nguyên vẹn có thể được tái tạo từ tế bào cây trồng, môi trường nuôi cấy mô cây trồng hoặc tế bào trần được nuôi cấy được biến nạp bằng cách sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong nhiều kỹ thuật đã biết. Sự tái tạo cây trồng từ tế bào cây trồng, môi trường nuôi cấy mô cây trồng hoặc tế bào trần được nuôi cấy được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Evans *et al.* (*Handbook of Plant Cell Cultures*, Vol. 1, MacMilan Publishing Co. New York (1983)); và Vasil

I. R. (ed.) (*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984), và Vol. II (1986)).

Ngoài ra, cá đặc điểm di truyền được thiết kế cho hạt và cây trồng, phần cây trồng, hoặc tế bào cây trồng chuyển gen theo sáng chế được mô tả ở trên có thể được truyền bằng cách sinh sản hữu tính hoặc sinh trưởng sinh dưỡng và do đó có thể được duy trì và được nhân lên ở cây trồng con cháu. Nhìn chung, việc duy trì và nhân giống làm việc sử dụng các phương pháp nông nghiệp đã biết phát triển đến mục đích cụ thể như thu hoạch, gieo hạt hoặc cày bừa.

Do đó polynucleotit có thể được đưa vào cây trồng, phần cây trồng hoặc tế bào cây trồng theo số lượng cách bất kỳ mà đã biết rõ trong lĩnh vực, như được mô tả ở trên. Do đó, không có phương pháp cụ thể để đưa một hoặc nhiều polynucleotit vào cây, mà có thể sử dụng phương pháp bất kỳ mà cho phép một hoặc nhiều polynucleotit được tích hợp ổn định trong hệ gen của cây. Khi hơn một polynucleotit được đưa vào, polynucleotit tương ứng có thể được tập hợp thành một phần của phân tử axit nucleic đơn, hoặc phân tử axit nucleic riêng biệt, và có thể nằm trên các phân tử axit nucleic giống hoặc khác nhau. Theo đó, polynucleotit có thể được đưa vào tế bào quan tâm trong sự kiện biến nạp đơn, trong sự kiện biến nạp riêng rẽ, hoặc, ví dụ, trong thực vật, là một phần của yếu tố nhân giống.

Các phương án khác của sáng chế bao gồm sản phẩm thu hoạch được tạo ra từ cây trồng chuyển gen hoặc phần của chúng theo sáng chế, cũng như là sản phẩm đã được xử lý được tạo ra từ sản phẩm thu hoạch. Các sản phẩm thu hoạch có thể là tổng thể cây hoặc bộ phận bất kỳ của cây, như được mô tả ở đây. Do đó, theo một số phương án, các ví dụ không giới hạn của sản phẩm thu hoạch bao gồm hạt, quả, hoa hoặc bộ phận của chúng (ví dụ, bao phấn, nhụy, và tương tự), lá, thân, và tương tự. Theo các phương án khác, sản phẩm xử lý bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bột mịn, bột xay thô, dầu, tinh bột, ngũ cốc, và tương tự được tạo ra từ hạt được thu hoạch hoặc bộ phận khác của cây theo sáng chế, trong đó hạt này hoặc bộ phận khác của cây bao gồm trình tự phân tử axit nucleic/polynucleotit/nucleotit theo sáng chế.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chất chiết từ hạt chuyển gen hoặc cây trồng chuyển gen theo sáng chế, trong đó chất chiết có chứa phân tử axit nucleic, polynucleotit, trình tự nucleotit hoặc protein gây độc theo sáng chế. Chiết xuất từ cây

hoặc bộ phận của cây có thể được làm theo các quy trình đã biết trong lĩnh vực (*Xem, de la Torre et al., Food, Agric. Environ. 2(1):84-89 (2004); Guidet, Nucleic Acids Res. 22(9): 1772-1773 (1994); Lipton et al., Food Agric. Immun. 12:153-164 (2000)*)).

Chế phẩm diệt côn trùng

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm diệt côn trùng bao gồm protein Cry theo sáng chế trong chất mang nông dụng. Như được dùng trong bản mô tả này "chất mang nông dụng" có thể bao gồm nguyên liệu hữu cơ hoặc vô cơ, tự nhiên hoặc tổng hợp mà được kết hợp với protein Cry hoạt tính để làm thuận lợi cho việc áp dụng nó cho hoặc trong cây trồng, hoặc phần của chúng. Các ví dụ của chất mang nông dụng bao gồm, không giới hạn, bột, bụi, viên, hạt, dịch phun, nhũ tương, chất keo, và dung dịch. Chất mang nông dụng còn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thành phần trợ, chất phân tán, chất hoạt động bề mặt, tá dược, chất dính, chất dán, chất liên kết, hoặc các kết hợp của chúng, mà có thể được sử dụng trong chế phẩm nông nghiệp. Các chế phẩm này có thể được áp dụng theo cách bất kỳ mà mang protein diệt loài gây hại hoặc tác nhân kiểm soát loài gây hại khác tiếp xúc với loài gây hại. Theo đó, chế phẩm có thể được áp dụng lên bề mặt của cây hoặc bộ phận của cây, bao gồm hạt, lá, hoa, thân, cuống, rễ, và tương tự. Theo phương án khác, cây trồng sản xuất protein Cry theo sáng chế ở thực vật là chất mang dùng trong nông nghiệp của protein Cry được biểu hiện.

Theo phương án khác, chế phẩm diệt côn trùng có chứa tế bào vi khuẩn hoặc tế bào vi khuẩn chuyển gen theo sáng chế, trong đó tế bào vi khuẩn hoặc tế bào vi khuẩn chuyển gen sản xuất protein Cry theo sáng chế. Chế phẩm diệt côn trùng này có thể được điều chế bằng cách làm mất nước, làm đông khô, đồng nhất hóa, chiết, lọc, ly tâm, lắng, hoặc cô môi trường nuôi cấy của *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Môi trường nuôi cấy *Bt* này có thể được chọn từ nhóm của các chủng *Bt* gồm có C0633, C0724, C1100 được mô tả dưới đây trong các Ví dụ hoặc môi trường nuôi cấy *Bt* chuyển gen. Theo các phương án bổ sung, chế phẩm bao gồm từ khoảng 1% đến khoảng 99% theo khối lượng của protein Cry theo sáng chế.

Protein Cry theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân kiểm soát loài gây hại khác để làm tăng phạm vi đích loài gây hại hoặc để ngăn ngừa hoặc quản lý tính kháng côn trùng. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm mà

kiểm soát một hoặc nhiều loài gây hại cây trồng, trong đó chế phẩm bao gồm protein Cry thứ nhất theo sáng chế và tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai khác protein Cry thứ nhất. Theo các phương án khác, chế phẩm là chế phẩm để áp dụng cục bộ cho cây trồng. Theo các phương án khác nữa, chế phẩm là cây trồng chuyển gen. Theo các phương án khác nữa, chế phẩm là dạng kết hợp của các chế phẩm được áp dụng cục bộ lên cây trồng chuyển gen. Theo một số phương án, chế phẩm có chứa protein Cry thứ nhất theo sáng chế khi cây trồng chuyển gen có chứa tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai. Theo phương án khác, chế phẩm có chứa tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai khi cây trồng chuyển gen có chứa protein Cry thứ nhất theo sáng chế.

Theo một số phương án, tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai có thể là tác nhân được chọn từ nhóm gồm có chất diệt loài gây hại hóa học, chẳng hạn như chất diệt côn trùng, protein diệt côn trùng *Bacillus thuringiensis* (Bt), protein diệt côn trùng *Xenorhabdus*, protein diệt côn trùng *Photorhabdus*, protein diệt côn trùng *Brevibacillus laterosporus*, protein diệt côn trùng *Bacillus sphaericus*, chất ức chế proteaza (cả loại serin và loại cystein), lectin, alpha -amylaza, peroxidaza, cholesterol oxidaza và phân tử ARN sợi kép (dsARN).

Theo phương án khác, tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai là chất diệt loài gây hại hóa học được chọn từ nhóm gồm có pyrethroid, carbamat, neonicotinoid, chất phong bế kênh natri thần kinh, lacton vòng lớn diệt côn trùng, chất đối kháng axit gamma-aminobutyric (GABA), ure diệt côn trùng và chất giả hormone kích sâu non. Theo phương án khác, chất diệt loài gây hại hóa học được chọn từ nhóm gồm có abamectin, axephat, axetamiprid, amidoflomet (S-1955), avermectin, azadirachtin, azinphos-methyl, bifenthrin, binfenazat, buprofezin, carbofuran, chlorfenapyr, chlorfluazuron, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, chromafenozit, clothianidin, xyfluthrin, beta-xyfluthrin, xyhalothrin, lambda-xyhalothrin, xypermethrin, xyromazin, deltamethrin, diafenthiuron, diazinon, diflubenzuron, dimethoat, diofenolan, emamectin, endosulfan, esfenvalerat, ethiprol, fenothicarb, fenoxycarb, fenpropathrin, fenproximat, fenvalerat, fipronil, flonicamid, fluxythrinate, tau-fluvalinat, flufenimer (UR-50701), flufenoxuron, fonophos, halofenozit, hexaflumuron, imidacloprid, indoxacarb, isofenphos, lufenuron, malathion, metaldehyt, methamidophos, methidathion, methomyl, methopren, methoxychlor, monocrotophos, methoxyfenozit, nithiazin, novaluron, noviflumuron (XDE-007),

oxamyl, parathion, parathion-metyl, permethrin, phorat, phosalon, phosmet, phosphamidon, pirimicarb, profenofos, pymetrozin, pyridalyl, pyriproxyfen, rotenon, spinosad, spiromesifin (BSN 2060), sulprofos, tebufenozit, teflubenzuron, tefluthrin, terbufos, tetrachlorvinphos, thiacloprid, thiamethoxam, thiodicarb, thiosultap-natri, tralomethrin, trichlorfon và triflumuron, aldicarb, oxamyl, fenamiphos, amitraz, chinomethionat, clorobenzilat, xyhexatin, đicofol, dienochlor, etoxazol, fenazaquin, fenbutatin oxit, fenpropathrin, fenpyroximat, hexythiazox, propargit, pyridaben và tebufenpyrad. Theo phương án khác nữa, chất diệt loài gây hại hóa học được chọn từ nhóm gồm có xypermethrin, xyhalothrin, xyfluthrin và beta-xyfluthrin, esfenvalerat, fenvalerat, tralomethrin, fenothicarb, methomyl, oxamyl, thiodicarb, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, indoxacarb, spinosad, abamectin, avermectin, emamectin, endosulfan, ethiprol, fipronil, flufenoxuron, triflumuron, điofenolan, pyriproxyfen, pymetrozin và amitraz.

Theo các phương án bổ sung, tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai có thể là một hoặc nhiều trong số bất kỳ các protein diệt côn trùng *Bacillus thuringiensis* bao gồm nhưng không giới hạn ở protein Cry, protein diệt côn trùng sinh dưỡng (VIP) và chất bắt chước diệt côn trùng của bất kỳ trong số các protein diệt côn trùng nêu trên. Theo phương án khác, tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai là protein Cry được chọn từ nhóm gồm có Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ad, Cry1Ae, Cry1Af, Cry1Ag, Cry1Ah, Cry1Ai, Cry1Aj, Cry1Ba, Cry1Bb, Cry1Bc, Cry1Bd, Cry1Be, Cry1Bf, Cry1Bg, Cry1Bh, Cry1Bi, Cry1Ca, Cry1Cb, Cry1Da, Cry1Db, Cry1Dc, Cry1Dd, Cry1Ea, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry1Fb, Cry1Ga, Cry1Gb, Cry1Gc, Cry1Ha, Cry1Hb, Cry1Hc, Cry1Ia, Cry1Ib, Cry1Ic, Cry1Id, Cry1Ie, Cry1If, Cry1Ig, Cry1Ja, Cry1Jb, Cry1Jc, Cry1Jd, Cry1Ka, Cry1La, Cry1Ma, Cry1Na, Cry1Nb, Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac, Cry2Ad, Cry2Ae, Cry2Af, Cry2Ag, Cry2Ah, Cry2Ai, Cry2Aj, Cry2Ak, Cry2Al, Cry2Ba, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry4Ca, Cry4Cb, Cry4Cc, Cry5Aa, Cry5Ab, Cry5Ac, Cry5Ad, Cry5Ba, Cry5Ca, Cry5Da, Cry5Ea, Cry6Aa, Cry6Ba, Cry7Aa, Cry7Ab, Cry7Ac, Cry7Ba, Cry7Bb, Cry7Ca, Cry7Cb, Cry7Da, Cry7Ea, Cry7Fa, Cry7Fb, Cry7Ga, Cry7Gb, Cry7Gc, Cry7Gd, Cry7Ha, Cry7Ia, Cry7Ja, Cry7Ka, Cry7Kb, Cry7La, Cry8Aa, Cry8Ab, Cry8Ac, Cry8Ad, Cry8Ba, Cry8Bb, Cry8Bc, Cry8Ca, Cry8Da, Cry8Db, Cry8Ea, Cry8Fa, Cry8Ga, Cry8Ha, Cry8Ia, Cry8Ib, Cry8Ja, Cry8Ka, Cry8Kb, Cry8La,

Cry8Ma, Cry8Na, Cry8Pa, Cry8Qa, Cry8Ra, Cry8Sa, Cry8Ta, Cry9Aa, Cry9Ba, Cry9Bb, Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Db, Cry9Dc, Cry9Ea, Cry9Eb, Cry9Ec, Cry9Ed, Cry9Ee, Cry9Fa, Cry9Ga, Cry10Aa, Cry11Aa, Cry11Ba, Cry11Bb, Cry12Aa, Cry13Aa, Cry14Aa, Cry14Ab, Cry15Aa, Cry16Aa, Cry17Aa, Cry18Aa, Cry18Ba, Cry18Ca, Cry19Aa, Cry19Ba, Cry19Ca, Cry20Aa, Cry20Ba, Cry21Aa, Cry21Ba, Cry21Ca, Cry21Da, Cry21Ea, Cry21Fa, Cry21Ga, Cry21Ha, Cry22Aa, Cry22Ab, Cry22Ba, Cry22Bb, Cry23Aa, Cry24Aa, Cry24Ba, Cry24Ca, Cry25Aa, Cry26Aa, Cry27Aa, Cry28Aa, Cry29Aa, Cry29Ba, Cry30Aa, Cry30Ba, Cry30Ca, Cry30Da, Cry30Db, Cry30Ea, Cry30Fa, Cry30Ga, Cry31Aa, Cry31Ab, Cry31Ac, Cry31Ad, Cry32Aa, Cry32Ab, Cry32Ba, Cry32Ca, Cry32Cb, Cry32Da, Cry32Ea, Cry32Eb, Cry32Fa, Cry32Ga, Cry32Ha, Cry32Hb, Cry32Ia, Cry32Ja, Cry32Ka, Cry32La, Cry32Ma, Cry32Mb, Cry32Na, Cry32Oa, Cry32Pa, Cry32Qa, Cry32Ra, Cry32Sa, Cry32Ta, Cry32Ua, Cry33Aa, Cry34Aa, Cry34Ab, Cry34Ac, Cry34Ba, Cry35Aa, Cry35Ab, Cry35Ac, Cry35Ba, Cry36Aa, Cry37Aa, Cry38Aa, Cry39Aa, Cry40Aa, Cry40Ba, Cry40Ca, Cry40Da, Cry41Aa, Cry41Ab, Cry41Ba, Cry42Aa, Cry43Aa, Cry43Ba, Cry43Ca, Cry43Cb, Cry43Cc, Cry44Aa, Cry45Aa, Cry46Aa, Cry46Ab, Cry47Aa, Cry48Aa, Cry48Ab, Cry49Aa, Cry49Ab, Cry50Aa, Cry50Ba, Cry51Aa, Cry52Aa, Cry52Ba, Cry53Aa, Cry53Ab, Cry54Aa, Cry54Ab, Cry54Ba, Cry55Aa, Cry56Aa, Cry57Aa, Cry57Ab, Cry58Aa, Cry59Aa, Cry59Ba, Cry60Aa, Cry60Ba, Cry61Aa, Cry62Aa, Cry63Aa, Cry64Aa, Cry65Aa, Cry66Aa, Cry67Aa, Cry68Aa, Cry69Aa, Cry69Ab, Cry70Aa, Cry70Ba, Cry70Bb, Cry71Aa, Cry72Aa và Cry73Aa.

Theo phương án khác, tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai là Vip3 protein diệt côn trùng ở thực vật được chọn từ nhóm gồm có Vip3Aa1, Vip3Aa2, Vip3Aa3, Vip3Aa4, Vip3Aa5, Vip3Aa6, Vip3Aa7, Vip3Aa8, Vip3Aa9, Vip3Aa10, Vip3Aa11, Vip3Aa12, Vip3Aa13, Vip3Aa14, Vip3Aa15, Vip3Aa16, Vip3Aa17, Vip3Aa18, Vip3Aa19, Vip3Aa20, Vip3Aa21, Vip3Aa22, Vip3Aa23, Vip3Aa24, Vip3Aa25, Vip3Aa26, Vip3Aa27, Vip3Aa28, Vip3Aa29, Vip3Aa30, Vip3Aa31, Vip3Aa32, Vip3Aa33, Vip3Aa34, Vip3Aa35, Vip3Aa36, Vip3Aa37, Vip3Aa38, Vip3Aa39, Vip3Aa40, Vip3Aa41, Vip3Aa42, Vip3Aa43, Vip3Aa44, Vip3Ab1, Vip3Ab2, Vip3Ac1, Vip3Ad1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1, Vip3Af2, Vip3Af3,

Vip3Ag1, Vip3Ag2, Vip3Ag3 HM117633, Vip3Ag4, Vip3Ag5, Vip3Ah1, Vip3Ba1, Vip3Ba2, Vip3Bb1, Vip3Bb2 và Vip3Bb3.

Theo các phương án khác nữa, protein Cry thứ nhất theo sáng chế và tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai được đồng biểu hiện trong cây trồng chuyển gen. Việc đồng biểu hiện của nhiều hơn một gốc diệt loài gây hại trong cùng cây trồng chuyển gen có thể thu được bằng cách thiết kế gen của cây để chứa và biểu hiện tất cả các gen cần thiết. Tùy ý, cây trồng, Bố mẹ 1, có thể được thiết kế gen để biểu hiện protein Cry theo sáng chế. Cây trồng thứ hai, Bố mẹ 2, có thể được thiết kế di truyền để biểu hiện của tác nhân kiểm soát loài gây hại thứ hai. Bằng cách lai Bố mẹ 1 với Bố mẹ 2, cây thế hệ con cái thu được mà biểu hiện tất cả các gen được đưa vào Bố mẹ 1 và 2.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất cây trồng chuyển gen xếp chồng kháng với sự phá hoại cây trồng bởi loài gây hại có chứa trình tự ADN mã hóa cho dsARN để kìm hãm gen thiết yếu ở loài gây hại đích và trình tự ADN mã hóa cho protein Cry theo sáng chế thể hiện hoạt tính sinh học chống lại loài gây hại đích. Đã có báo cáo rằng dsARN không hữu hiệu để chống lại loài gây hại là sâu bọ cánh vảy nhất định (Rajagopol et al. 2002. J. Biol. Chem. 277:468-494), có thể do độ pH cao của trung tràng mà làm mất ổn định dsARN. Do đó, theo một số phương án khi loài gây hại đích là loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, protein Cry theo sáng chế tác động làm giảm tạm thời độ pH trung tràng mà đáp ứng làm ổn định dsARN được tiêu hóa đồng thời mang lại dsARN hữu hiệu trong việc làm câm gen đích.

Ngoài việc đề xuất chế phẩm, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất protein Cry gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy. Phương pháp này bao gồm bước, nuôi cấy tế bào chủ không phải ở người chuyển gen mà có chứa polynucleotit hoặc gen khảm hoặc phân tử axit nucleic hoặc vector tái tổ hợp theo sáng chế trong điều kiện trong đó tế bào chủ sản xuất protein gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy. Theo một số phương án, tế bào chủ chuyển gen không phải của người là tế bào của cây trồng. Theo một số phương án khác, tế bào cây trồng là tế bào ngô. Theo các phương án khác, các điều kiện mà tế bào của cây hoặc tế bào cây ngô phát triển bao gồm ánh sáng mặt trời tự nhiên. Theo các phương án khác, tế bào chủ chuyển gen không phải của người là tế bào vi khuẩn. Theo các phương án khác nữa, tế bào chủ chuyển gen không phải của người là tế bào nấm men.

Theo phương án khác của phương pháp, loài gây hại là sâu bọ cánh vảy được chọn từ nhóm gồm có sâu đục thân ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu ngài đêm màu đen (*Agrotis ipsilon*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu bướm đậu nhung (*Anticarsia gemmatilis*), sâu đo hại đậu tương (*Chrysodeixis includens*), sâu đục thân ngô tây nam (*Diatraea grandiosella*), sâu ngài đêm hại đậu phương tây (*Richia albicosta*), sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu đục thân ngô Châu Á (*Ostrinia furnacalis*), sâu đục quả bông (*Helicoverpa armigera*), sâu đục thân có sọc (*Chilosuppressalis*), sâu đục thân màu hồng (*Sesamia calamistis*), sâu cuốn lá lúa (*Cnaphalocrocis medinalis*), và dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo phương án khác của phương pháp, gen khảm có chứa trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:1-3, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng. Theo các phương án khác nữa, protein được tạo ra bao gồm trình tự axit amin nêu trong trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 10-12, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo một số phương án của phương pháp, gen khảm có chứa trình tự nucleotit mà được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở thực vật. Theo phương án khác, gen khảm có chứa trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:4-9, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của chúng. Theo phương án khác, protein được tạo ra có chứa trình tự axit amin của trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO:10-15, hoặc mảnh độc tố của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất cây trồng chuyển gen kháng loài gây hại (ví dụ như, kháng côn trùng), có chứa: bước đưa polynucleotit, gen khảm, vectơ tái tổ hợp, băng catxet biểu hiện hoặc phân tử axit nucleic theo sáng chế có chứa trình tự nucleotit mà mã hóa cho protein Cry theo sáng chế vào cây trồng, trong đó trình tự nucleotit được biểu hiện trong cây trồng, bằng cách đó mang lại cho cây trồng tính kháng đối với ít nhất là côn trùng gây hại là sâu bọ cánh vảy, và tạo ra cây trồng chuyển gen kháng côn trùng. Theo một số phương án, cây trồng chuyển gen kháng loài gây hại kháng với ít nhất là sâu đục thân ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*) hoặc sâu ngài đêm màu đen (*Agrotis ipsilon*) khi so sánh với cây trồng đối chứng thiếu polynucleotit, gen khảm, vectơ tái tổ hợp, băng catxet biểu hiện hoặc phân tử axit nucleic theo sáng chế. Theo một số phương án, việc đưa vào đạt được bằng cách biến nạp cây. Theo các phương án khác, việc đưa vào đạt được bằng

cách lai cây thứ nhất chứa gen khảm, vectơ tái tổ hợp, băng catxet biểu hiện hoặc phân tử axit nucleic theo sáng chế với cây thứ hai khác.

Theo một số phương án, cây trồng chuyển gen theo sáng chế mà kháng với ít nhất là sâu đục thân ngô châu Âu (*Ostrinia nubilalis*) hoặc sâu ngài đêm màu đen (*Agrotis ipsilon*) còn kháng với ít nhất là một côn trùng khác, trong đó côn trùng khác này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*), sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu đục thân mía (*Diatraea saccharalis*), sâu bướm đậu nhung (*Anticarsia gemmatilis*), sâu đo hại đậu tương (*Chrysodeixis includes*), sâu đục thân ngô tây nam (*Diatraea grandiosella*), sâu ngài đêm hại đậu phương tây (*Richia albicosta*), sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*), sâu đục thân ngô châu Á (*Ostrinia furnacalis*), sâu đục quả bông (*Helicoverpa armigera*), sâu đục thân có sọc (*Chilo suppressalis*), sâu đục thân màu hồng (*Sesamia calamistis*) hoặc sâu cuốn lá lúa (*Cnaphalocrocis medinalis*), và dạng kết hợp bất kỳ của chúng.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát ít nhất là côn trùng gây hại là sâu bọ cánh vảy chẳng hạn như sâu đục thân ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*) hoặc sâu ngài đêm màu đen (*Agrotis ipsilon*), phương pháp này có chứa bước phân phối cho côn trùng lượng hữu hiệu của protein Cry theo sáng chế. Để có hiệu quả, protein Cry đầu tiên được côn trùng ăn vào bụng qua đường miệng. Tuy nhiên, protein Cry được phân phối đến côn trùng theo nhiều cách đã biết. Các cách để phân phối protein theo đường miệng đến côn trùng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cung cấp protein (1) ở cây trồng chuyển gen, trong đó côn trùng ăn (ăn vào bụng) một hoặc nhiều phần của cây trồng chuyển gen, bằng cách đó tiêu hóa polypeptit mà được biểu hiện trong cây trồng chuyển gen; (2) trong (các) chế phẩm protein được tạo chế phẩm mà có thể được áp dụng cho hoặc được kết hợp vào, ví dụ, môi trường sinh trưởng côn trùng; (3) trong (các) chế phẩm protein mà có thể được áp dụng cho bề mặt, ví dụ, được phun, lên trên bề mặt của phần cây trồng, mà sau đó được ăn vào bụng bởi côn trùng khi côn trùng ăn một hoặc nhiều phần cây trồng được phun; (4) chất nền môi; hoặc (5) hệ thống phân phối protein khác bất kỳ đã biết trong lĩnh vực. Do đó, phương pháp phân phối qua đường miệng bất kỳ đến côn trùng có thể được dùng để phân phối protein Cry độc theo sáng chế. Theo một số phương án cụ thể,

protein Cry theo sáng chế được phân phối theo đường miệng đến côn trùng, trong đó côn trùng ăn vào bụng một hoặc nhiều phần của cây trồng chuyển gen.

Theo các phương án khác, protein Cry theo sáng chế được phân phối theo đường miệng đến côn trùng, trong đó côn trùng ăn vào bụng một hoặc nhiều phần của cây được phun với chế phẩm bao gồm các protein Cry theo sáng chế. Phân phối chế phẩm theo sáng chế lên bề mặt cây có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để áp dụng hợp chất, chế phẩm, công thức và tương tự lên bề mặt cây. Một số ví dụ không giới hạn phân phối hoặc cho tiếp xúc cây hoặc bộ phận của nó bao gồm phun, rải bụi, rải, tung rắc, sương mù, tán nhỏ, truyền phát, ngâm, bơm vào đất, kết hợp với đất, làm ướt sũng (ví dụ, rễ, xử lý đất), nhúng, rót, bao, thấm qua lá hoặc thân, bọc hoặc xử lý hạt, và tương tự, và kết hợp của chúng. Các quy trình này và quy trình khác để cho cây hoặc bộ phận của nó tiếp xúc với (các) hợp chất, (các) chế phẩm hoặc (các) công thức là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Theo một số phương án, sáng chế bao hàm phương pháp cung cấp cho nông dân phương thức kiểm soát loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, phương pháp này bao gồm bước cung ứng hoặc bán cho nông dân nguyên liệu cây trồng chẳng hạn như hạt, nguyên liệu cây trồng này có chứa polynucleotit, gen khảm, băng catxet biểu hiện hoặc vectơ tái tổ hợp có khả năng biểu hiện protein Cry theo sáng chế ở cây trồng sinh trưởng từ hạt này, như được mô tả ở trên.

Các phương án của sáng chế có thể được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo đến các ví dụ sau đây. Phân mô tả trên và sau đây của các phương án của sáng chế và các phương án khác nhau không nhằm giới hạn phạm vi bảo hộ, mà chỉ để minh họa cho yêu cầu bảo hộ. Do đó, cần hiểu rằng điểm không giới hạn ở các chi tiết cụ thể trong các ví dụ này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rằng các phương án khác của sáng chế có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi phạm vi và tinh thần của bản mô tả này, phạm vi của sáng chế được xác định trong yêu cầu bảo hộ kèm theo

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Xác định các chủng *Bt* hoạt tính

Các thể phân lập *Bacillus thuringiensis* được nuôi cấy từ các bào tử có mặt trong sự gom hiện tại và được giữ trên các tấm aga T3 + penixillin. Mỗi phân lập được nuôi lớn ưa khí trong các khối sâu 24 giếng trong khoảng 10 ngày ở 28°C đến khi hình thành bào tử, mà được kiểm tra bằng cách nhuộm màu bằng thuốc nhuộm xanh Coomassie/axit axetic và quan sát bằng kính hiển vi. Sau khi hình thành bào tử cả các phân tan và không tan được thử hoạt tính kháng các loài bộ cánh vảy quan tâm. Các mảnh được thử nghiệm trong thử nghiệm sinh học nhiễm xạ bề mặt, khi các mảnh được phủ lên khẩu phần nhân tạo đa loài. Mỗi thể phân lập được sàng lọc chống lại ít nhất là bốn loài sâu bộ cánh vảy, bao gồm *Helicoverpa zea* (sâu đục trái trên cây ngô), *Agrotis ipsilon* (sâu ngài đêm màu đen), *Ostrinia nubilalis* (sâu đục thân ngô Châu Âu), và *Spodoptera frugiperda* (sâu xanh mùa thu) với cỡ mẫu bằng 12 ấu trùng sơ sinh. Thời gian của mỗi thử nghiệm là khoảng 7 ngày ở nhiệt độ phòng; các tấm được chấm điểm đối với tỷ lệ chết cũng như ức chế tăng trưởng ấu trùng. Tỷ lệ chết quan sát được ở mức tăng bằng 30% so với đối chứng âm được coi là có hoạt tính. Dựa trên thử nghiệm côn trùng ban đầu, các chủng C0633, C0724 và C1100 được chọn để phân tích tiếp.

Ví dụ 2: Phân lập và xác định trình tự các gen *Bt*

Cấu trúc thư viện gen Fosmid: Đối với một số chủng *Bt* mà được xác định trong ví dụ 1, gen mã hóa cho protein có hoạt tính giả định được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp thư viện fosmid về cơ bản như được mô tả trong tài liệu Park *et al.* (FEMS Lett. 284:28-34 (2008)). Thư viện fosmid được cấu trúc bằng cách sử dụng bộ kit sản xuất thư viện Fosmid CopyControl™ (Epicentre, Madison, WI) theo nguyên tắc của nhà sản xuất. Tóm lại, ADN đã được tinh chế từ mỗi chủng *Bt* (xấp xỉ 0,5 µg) được xử lý bằng enzym để sửa chữa đầu đối với các đầu cụt, và sau đó được nối vào vật truyền fosmid pCC1FOS (Epicentre). Sau khi đóng gói *in vitro* vào phagơ lambda và gây nhiễm *Escherichia coli* (*E. coli*) EPI1300-T1®, tế bào vi khuẩn được cho vào đĩa trên Luria-Bertani (LB) mà chứa 12,5 µg/ml cloramphenicol. Các đĩa được ủ ở khoảng 37°C trong 24 giờ trước khi chọn khuẩn lạc. Các khuẩn lạc *E. coli* đã được chuyển nhiễm được chuyển vào đĩa 96 giếng mà chứa 150 µl môi trường LB có chứa cloramphenicol và được ủ ở 37°C trong 24 giờ.

Sàng lọc lai hóa khuẩn lạc: Thư viện fosmid được cho ra đĩa ở mật độ 300 cfu trong mỗi đĩa 100 x15 mm L-agar cộng với 15 µg/ml cloramphenicol. Tổng số 3000 fosmid được cho ra đĩa. Lai hóa bộ lọc được thực hiện bằng cách sử dụng vòng lọc Immobilon-Ny+ 87 mm (EMD Millipore, Billerica, MA). Sự nâng lên của khuẩn lạc được hoàn thành như sau: bộ lọc được đặt trên đĩa trong khoảng 5 phút, sau đó bằng cách sử dụng cái kẹp, bộ lọc được nâng lên từ bề mặt agar và đặt khuẩn lạc hướng lên trên trên giấy lọc Whatman được nhúng với NaOH 0,5 M trong 5 phút. Sau đó đặt bộ lọc khuẩn lạc trên giấy lọc Whatman được nhúng trong 2X SSC trong 5 phút. ADN được cố định vào màng bằng bộ UV Stratalinker® ở 2000 x100 µJ (Stratagene, Inc., La Jolla, CA). Sau đó màng lọc được phơi khô trong không khí trên giấy lọc Whatman. Màng lọc được lai trước và được lai trong 250 mM NaPO₄, độ pH 7,0, 7% SDS, 1% BSA ở 65°C như được mô tả bởi nhà cung cấp. Rửa bộ lọc lai hóa trong 2X SSC, 0,5% SDS trong 30 phút ở 65°C, sau đó là 0,2X SSC, 0,2% SDS trong 30 phút ở 65°C. Để cho bộ lọc lộ ra với phim X quang (Kodak® BIOMAX® XAR, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) qua đêm với màn tăng cường ở -80°C. Đắp các khuẩn lạc dương tính vào L agar có thêm 15 µg/ml cloramphenicol.

Đoạn dò lai hóa: Các đoạn mồi PCR được thiết kế để khuếch đại mảnh gen giống ocr2 từ ADN hệ gen của chủng *Bt* được thiết kế C0633. Cặp đoạn mồi bao gồm đoạn mồi xuôi được thiết kế OAR2609a có trình tự GTTTAAACATGAATAATGTATTGAATAGCG (SEQ ID NO:16) và đoạn mồi ngược được thiết kế OAR2610a có trình tự GGCGCGCCTTAATACAGTGGTAGAAGATTAG (SEQ ID NO:17). Phản ứng PCR được chạy dưới các điều kiện chu kỳ sau: [94°C, 5 phút], 25x [94°C, 30 giây, 55°C, 30 giây, 72°C 2 phút]. Hỗn hợp phản ứng chứa 1X chất đệm One Taq® (New England Biolabs, Beverly, MA), 200 µM dNTP, 80 ng ADN, 2,5U One Taq® ADN polymeraza, 50 ng mỗi đoạn mồi và nước chung cất tiệt trùng đến 50 µl tổng hỗn hợp phản ứng.

Amplicon thu được được tách trên 1% agarose TAE gel chứa ethid bromua. Amplicon được quan sát dưới ánh sáng UV và cắt gel. ADN được phân lập sử dụng bộ kit chiết gel như được mô tả bởi nhà cung cấp (Qiagen, Valencia, CA). Các mẫu dò được đánh dấu EasyTide (α-32P) dCTP 3000 Ci/mmol (Perkin Elmer, Waltham, MA) sử dụng hệ đánh dấu đoạn mồi ngẫu nhiên Rediprime II (GE Healthcare, Pittsburgh,

PA). Nucleotit không kết hợp được loại ra bằng cách sử dụng các cột sắc ký Micro Bio-Spin 30 (Biorad, Hercules, CA). Các mẫu dò được gia nhiệt ở 95°C trong 5 phút trước khi thêm dung dịch lai.

Xác định trình tự gen Bt: ADN điều chế cho 2-4 hệ vô tính độc lập được chuẩn bị theo chỉ dẫn của nhà sản xuất (Qiagen). Phản ứng xác định trình tự với đoạn môi được thiết kế cho cả hai mạch của trình tự nucleotit dự báo quan tâm được thực hiện bằng cách sử dụng bộ kit Trình tự kết thúc BigDye™ (Applied Biosystem, Foster City, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm phản ứng được điện di trên thiết bị xác định trình tự ABI373 hoặc ABI377. Tất cả dữ liệu xác định trình tự được phân tích sử dụng gói phần mềm Phred/Phrap/Consed (University of Washington) cho tỷ lệ sai bằng hoặc nhỏ hơn 10^{-4} ở mức trình tự liên ứng. Trình tự được lắp ráp bằng chương trình Sequencher™ (Phiên bản 4.7, Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI). Mỗi gen được xác định trình tự đến độ bao phủ 4X.

Ví dụ 3. Tách dòng và tổng hợp gen Bt

Cặp đoạn môi đặc hiệu Cry2 được thiết kế để làm thuận lợi cho sự nhận diện và tách dòng các gen kiểu cry2. Cặp đoạn môi được thiết kế để lai hóa với đầu 5' của gen kiểu cry2 có bổ sung vị trí giới hạn *PmeI* và với đầu 3' có bổ sung vị trí giới hạn *AscI*. Đoạn môi xuôi 5' được thiết kế OAR2609a có trình tự GTTTAAACATGAATAATGTATTGAATAGG (SEQ ID NO:16) và đoạn môi ngược OAR2610a có trình tự GGCGCGCCCTACTCTTGTGTTTCAATAAA (SEQ ID NO:17). Các vị trí giới hạn được chèn vào được chèn trong các đoạn môi tương ứng. Phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các điều kiện chu kỳ sau đây: 30x [98°C, 10 giây, 55°C, 30 giây, 72°C, 2 phút]. Hỗn hợp phản ứng chứa 1X Phusion HF buffer, 200 µM dNTP, 80 ng ADN, 1U Phusion ADN polymeraza (New England Biolabs), 50 ng mỗi đoạn môi và nước chung cất tiệt trùng đến 50 µl tổng hỗn hợp phản ứng.

Phản ứng PCR được làm sạch bằng cách sử dụng bộ kit làm sạch và cô ADN Zymo Research. ADN được phân giải bằng 10 U *AscI* (New England Biolabs) với 2,4 µg amplicon, 1X chất đệm Cutsmart trong 40 µl và sau đó được ủ ở 37°C trong thời gian 3 giờ. ADN đã phân giải được làm sạch bằng cách sử dụng bộ kit làm sạch và cô ADN Zymo Research.

Amplicon thu được được tách dòng vào vật truyền TOPO pCR 4.0 như được mô tả bởi nhà cung cấp (Life Technologies). Plasmid ADN được phân lập được phân giải bằng *PmeI* và *AscI* như được mô tả bởi nhà cung cấp (New England Biolabs).

Đoạn *PmeI/AscI* được tách dòng vào vật truyền hình thoi được thiết kế pCIB5634⁺ được thiết kế để biểu hiện trong cả *E. coli* và *B. thuringiensis*. Vật truyền pCIB5634⁺ được phân giải bằng *PmeI* và *AscI*. Vật truyền được phân giải và mảnh gen được tinh chế bằng cách chạy trên 1% gel trên cơ sở đệm agarosa Tris Axetat EDTA. Các mảnh bị cắt khỏi gel và làm sạch bằng cách sử dụng bộ kit chiết gel QIAGEN như được mô tả bởi nhà cung cấp. Các đoạn được nối với nhau sử dụng bộ kit nối từ New England Biolabs như được mô tả bởi nhà cung cấp. Phản ứng nối được biến nạp vào các tế bào TOP10 (Life Technologies) như được mô tả bởi nhà cung cấp và được đặt trên L-aga chứa 100 mg/ml ampicillin. Plasmid ADN được phân lập từ khuẩn lạc đơn và dòng vô tính đã được xác định được xác định trình tự lại thành 2X độ bao phủ để xác nhận trình tự đúng.

Một số gen Bt mà được chọn để tạo ra tái tổ hợp nhưng không được tách dòng trực tiếp ngoài ADN hệ gen được bổ sung cho nhà cung cấp thứ ba để tổng hợp tổng thể gen. Các gen Bt được tổng hợp được tách dòng phụ vào vật truyền hình thoi được mô tả để biểu hiện tiếp và thử thêm hoạt tính sinh học.

Ví dụ 4. Lắp ráp và phân tích hệ gen

Một số gen *Btcr1* theo sáng chế được phân lập từ các chủng được xác định trong ví dụ 1 bằng cách sử dụng phương pháp xác định trình tự hệ gen tổng số. Tóm lại, ADN của *Bacillus* được cắt bằng cách sử dụng thiết bị siêu âm Covaris S2 (Covaris, Inc., Woburn, MA) với chương trình ADN_400bp được cài đặt ở chu kỳ hoạt động: 10%; cường độ: 4; chu kỳ/nỗ: 200. ADN được xử lý bằng mô hình sửa đầu/nối đuôi dA NEBNext[®] Ultra[™] (New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA). Các chuỗi tiếp hợp chỉ số Biooscience 1-57 (1-27 Braxin, 28-57 Mỹ, Vương Quốc Anh và Thụy Sĩ) được nối lại sử dụng NEB Quick Ligation[™] như được mô tả bởi nhà cung cấp (New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA). Việc nối được làm sạch bằng cách sử dụng các hạt Agencourt AMPure XP như được mô tả bởi nhà cung cấp (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, IN).

Thư viện có kích thước được chia đoạn như sau: Mẫu 50ul được trộn với 45ul hỗn hợp hạt 75% (25% hạt AMPure cộng thêm dung dịch NaCl/PEG 75% TekNova cat # P4136). Hỗn hợp được khuấy và đặt trên giá từ. Dịch nổi bề mặt thu được được chuyển vào giếng mới và 45 ul hỗn hợp hạt 50% (50% hạt AMPure cộng với 50% dung dịch NaCl/PEG TekNova cat # P4136) được bổ sung. Hỗn hợp được khuấy và đặt trên giá từ. Dịch nổi thu được được loại ra và các hạt được rửa bằng 80% etanol. 25 ul đệm tách rửa (EB) được thêm và hỗn hợp được đặt trên giá từ. Dịch nổi thu được cuối cùng được loại ra và đặt vào ống 1,5 ml. Phương pháp này tạo ra các thư viện trong khoảng kích thước của các cặp bazơ (bp) ADN 525 (chèn thêm chuỗi tiếp hợp).

Thư viện ADN được định kích thước được khuếch đại sử dụng KAPA Biosystem HiFi Hot Start (Kapa Biosystem, Inc., Wilmington, MA) sử dụng các điều kiện chu kỳ sau đây: [98°C, 45 giây]; 12 x [98°C, 15 giây, 60°C, 30 giây, 72°C, 30 giây]; [72°C, 1 phút]. Mỗi hỗn hợp phản ứng chứa: 5 ul thư viện ADN, 1 ul đoạn môi thông thường Bioscience (25 uM), 18 ul nước vô trùng, 1ul đoạn môi được đánh số thứ tự Bioscience (25 uM), 25 ul 2X KAPA HiFi polymeraza.

Các thư viện được chạy trên thiết bị phân tích sinh học Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) sử dụng chip độ nhạy cao để xác định khoảng kích thước của thư viện và kích thước chèn trung bình. Tất cả các thư viện được xử lý xác định trình tự các đầu bắt cặp (PE) (100 chu kỳ mỗi lần đọc; 12-24 thư viện mỗi lần) trên hệ xác định trình tự HiSeq 2500 sử dụng nguyên tắc xác định trình tự của nhà sản xuất (Illumina, Inc., San Diego, CA).

Công cụ phân tích vi tính *Bacillus* được phát triển để nhận dạng và các định đặc điểm gen giống Cry được sử dụng để sắp xếp thứ tự ưu tiên của sự dẫn đầu để thử nghiệm thêm trong phòng thí nghiệm.

Sự lắp ráp và phân tích hệ gen cũng như là phân tích thư viện hệ gen được mô tả ở dẫn đến sự nhận diện của ba gen giống Cry2 trong các chủng *Bacillus thuringiensis* có độc tính đối với ít nhất là sâu đục thân ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*) hoặc sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*). Việc xác định đặc điểm của gen giống Cry2 và protein được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Gen/protein Cry được xác định trong các chủng *Bacillus thuringiensis*.

Chủng	Protein/Gen Tên	Thành Viên Họ Cry Gần Nhất	Khối lượng phân tử (kD)	Nucleotit SEQ ID NO:	Axit amin SEQ ID NO:
C0633	BT0016	Cry2Ba	70,7	1	10
C0724	BT0026	Cry2Aa	71,1	2	11
C1100	BT0032	Cry2Aa	70,8	3	12

Ví dụ 5. Độ tương đồng của BT0016, BT0026 và BT0032 với protein Cry Bt đã biết

Nghiên cứu dữ liệu protein với trình tự axit amin của các protein theo sáng chế thấy rằng chúng tương đồng với protein diệt côn trùng. Sự so sánh của trình tự axit amin của protein theo sáng chế với cơ sở dữ liệu không dư (nr) được duy trì bởi NCBI (world wide web ở ncbi.nlm.nih.gov) bằng cách sử dụng thuật toán BLAST cho thấy protein theo sáng chế có độ tương đồng cao nhất với protein trong họ Cry2. Cụ thể hơn, BT0016 có độ tương đồng khoảng 71% với protein Cry2A, các trình tự ví dụ của chúng có thể được tìm thấy ở NCBI với mã số truy cập M31738, M23724, X57252, AF200816, AAQ52362, EF439818, ACH91610 và EU939453, và độ tương đồng khoảng 88% với protein Cry2B, các trình tự ví dụ của chúng có thể được tìm thấy ở NCBI với mã số truy cập KC156658 và KF014123. BT0026 có độ tương đồng khoảng 77% với Cry2A protein và độ tương đồng khoảng 66% với protein Cry2B. BT0032 có độ tương đồng khoảng 88% với Cry2A protein và độ tương đồng khoảng 72% với protein Cry2B.

Ví dụ 6. Biểu hiện protein Bt trong tế bào chủ tái tổ hợp

Biểu hiện *Bacillus*. Protein Cry được mô tả trong ví dụ 4 được biểu hiện trong chủng *Bacillus thuringiensis* (Bt) không có tính thể không có hoạt tính diệt côn trùng nên có thể quan sát được thông qua vật truyền con thoi được thiết kế pCIB5634', được thiết kế để biểu hiện ở cả *E. coli* và Bt. Vật truyền pCIB5634' có chứa vùng khởi động Cry1Ac mà điều khiển sự biểu hiện của gen Cry Bt đã tách dòng và chất chỉ thị tính kháng erythromycin. Bể catxet biểu hiện có chứa trình tự mã hóa Cry được quan tâm được biến nạp vào chủng Bt vật chủ thông qua đục lỗ điện và các chủng Bt chuyển gen được chọn trên đĩa aga có chứa erythromycin. Các chủng Bt chuyển gen được chọn được cho sinh trưởng đến pha tạo bào tử trong môi trường T3 ở nhiệt độ 28°C

trong thời gian 4-5 ngày. Các viên tế bào được thu và rửa đi rửa lại trước khi hòa tan trong đệm cacbonat độ pH cao (50mM) chứa 2mM DTT.

Biểu hiện *E. coli*. Protein Cry được biểu hiện ở các chủng *E. coli* bằng cách sử dụng các vật truyền pET28a hoặc pET29a (Merck KGaA, Darmstadt, Đức). Cấu trúc được biến nạp bằng cách đục lỗ điện và các dòng *E. coli* chuyển gen được chọn trên đĩa aga có chứa kanamycin. Các chủng *E. coli* chuyển gen được chọn được cho sinh trưởng và sự biểu hiện protein Cry được gây ra bằng cách sử dụng sự cảm ứng IPTG ở nhiệt độ 28°C. Các tế bào được tạo huyền phù lại trong đệm carbonat độ pH cao (50mM) chứa 2mM DTT và sau đó phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất Microfluidics LV-1.

Phân tích biểu hiện. Sau đó dịch tan tế bào thu được từ các chủng *Bt* hoặc *E. coli* chuyển gen được phân loại thông qua ly tâm và các mẫu được phân tích về độ tinh sạch thông qua SDS-PAGE và điện di đồ bằng cách sử dụng hệ thống BioRad Experion (Biorad, Hercules, CA). Tổng nồng độ protein được xác định qua thử nghiệm Bradford hoặc Thermo 660. Sau đó protein Cry đã tinh chế được thử nghiệm trong các thử nghiệm sinh học được mô tả dưới đây.

Ví dụ 7. Hoạt tính của protein Cry trong thử nghiệm sinh học

Protein Cry được tạo ra trong ví dụ 6 được thử nghiệm chống lại một hoặc nhiều loài côn trùng gây hại sau đây bằng cách sử dụng phương pháp thử nghiệm sinh học chế độ ăn nhân tạo đã biết trong lĩnh vực: sâu xanh mùa thu (FAW; *Spodopterafrugiperda*), sâu đục trái trên cây ngô (CEW; *Helicoverpazea*), sâu đục thân ngô châu Âu (ECB; *Ostrinianubilalis*), sâu ngài đêm màu đen (BCW; *Agrotisipsilon*), sâu đục thân mía (SCB; *Diatraeasaccharlis*), sâu bướm đậu nhung (VBC; *Anticarsia gemmatalis*), sâu đo hại đậu tương (SBL; *Pseudoplusia includens*), sâu đục thân ngô tây nam (SWCB; *Diatraeagrandiosella*), sâu ngài đêm hại đậu phương tây (WBCW; *Striacostaalbicosta*), sâu ăn chồi thuốc lá (TBW; *Heliothis virescens*), sâu đục thân ngô châu Á (ACB; *Ostrinia furnacalis*), sâu đục quả bông (CBW; *Helicoverpa armigera*), sâu đục thân có sọc (SSB; *Chilosuppressalis*), sâu đục thân màu hồng (PSB; *Sesamia inferens*) và sâu cuốn lá lúa (RLF; *Cnaphalocrocis medinalis*).

Lượng bằng nhau của protein trong dung dịch được áp dụng lên bề mặt của các khẩu phần nhân tạo cho côn trùng (Bioserv, Inc., Frenchtown, NJ) trong đĩa 24 giếng. Sau khi bề mặt khẩu phần khô, ấu trùng của các loài côn trùng thử được thêm vào mỗi giếng. Các tấm được đóng kín và giữ ở điều kiện môi trường phòng thí nghiệm về nhiệt độ, ánh sáng và độ ẩm tương đối. Nhóm đối chứng dương bao gồm ấu trùng được lộ ra với chủng *Bacillus* kiểu dại có hoạt tính mạnh và phổ rộng. Nhóm đối chứng âm bao gồm ấu trùng được lộ ra với khẩu phần côn trùng được xử lý chỉ với dung dịch đệm và ấu trùng trên khẩu phần côn trùng không được xử lý; tức là chỉ khẩu phần. Tỷ lệ chết được đánh giá sau khoảng 120 giờ và cho điểm so với các đối chứng.

Kết quả được thể hiện trong bảng 2, trong đó "-" có nghĩa là không có hoạt tính so với nhóm đối chứng, "+/-" có nghĩa là hoạt tính 0-10% so với dấu kiểm tra (loại này cũng bao gồm tỉ lệ chết 0% với sự ức chế sinh trưởng ấu trùng mạnh), "+" có nghĩa là hoạt tính 10-25% so với dấu kiểm tra, "++" có nghĩa là hoạt tính 26-75% so với dấu kiểm tra, và "+++" có nghĩa là hoạt tính 76-100% so với dấu kiểm tra. Ký hiệu "nt" trong bảng 2 có nghĩa là protein được chỉ ra không được thử nghiệm chống lại loài gây hại cụ thể đó.

Bảng 2. Kết quả của thử nghiệm sinh học với protein Cry.

BT Protein	Các loài côn trùng								
	FAW	CEW	ECB	BCW	SCB	VBC	SBL	SWCB	TBW
0016	+/-	+/-	-	-	không kiểm tra	không kiểm tra	không kiểm tra	không kiểm tra	không kiểm tra
0026	-	++	-	-	-	không kiểm tra	không kiểm tra	không kiểm tra	không kiểm tra
0032	+	+/-	+++	-	-	+++	+++	-	+++

Ví dụ 8. Tạo vật truyền của gen để biểu hiện ở thực vật

Trước khi biểu hiện ở cây trồng, polynucleotit tổng hợp có chứa trình tự nucleotit mã hóa cho protein Cry đột biến, mBT-00032 (SEQ ID NO:15) được tổng hợp trên nền tảng tổng hợp gen tự động (Genscript, Inc., Piscataway, NJ). Đối với ví

dụ này, băng catxet biểu hiện thứ nhất được tạo ra có chứa vùng khởi động ubiquitin ở ngô (Ubi1) được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa protein Cry mà được liên kết có điều khiển với vùng kết thúc Nos và băng catxet biểu hiện thứ hai được tạo ra có chứa vùng khởi động Ubi1 được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa phosphomanoza isomeraza (PMI) mà được liên kết có điều khiển với vùng kết thúc Nos. Sự biểu hiện của PMI cho phép chọn lọc dương tính cây trồng chuyển gen trên manozơ. Cả hai băng catxet biểu hiện được tách dòng vào vật truyền thích hợp để biến nạp ngô qua trung gian *Agrobacterium*.

Ví dụ 9. Sự biểu hiện và hoạt tính của protein Cry ở cây ngô

Sự biến nạp của phôi ngô chưa trưởng thành được thực hiện về cơ bản giống như được mô tả trong tài liệu Negrotto et al., 2000, Plant Cell Reports 19: 798 803. Tóm lại, chủng *Agrobacterium* LBA4404 (pSB1) có chứa vật truyền biểu hiện được mô tả trong Ví dụ 5 được cho sinh trưởng trên YEP (dịch chiết nấm men (5 g/l), pepton (10 g/l), NaCl (5 g/l), 15g/l aga, độ pH 6,8) môi trường rắn trong thời gian 2- 4 ngày ở nhiệt độ 28°C. Xấp xỉ $0,8 \times 10^9$ tế bào *Agrobacterium* được tạo huyền phù trong môi trường LS-inf có bổ sung 100 μ M As. Vi khuẩn được cảm ứng trước trong môi trường này trong khoảng 30-60 phút.

Phôi chưa trưởng thành từ dòng ngô lai cùng dòng được cắt từ bông 8-12 ngày tuổi vào LS-inf lỏng + 100 μ M As. Phôi được rửa một lần bằng môi trường gây nhiễm mới. Sau đó dung dịch *Agrobacterium* được bổ sung vào và phôi được tạo xoáy trong 30 giây và cho xử lý bằng vi khuẩn trong 5 phút. Sau đó phôi được chuyển hướng phía hình vảy lên vào môi trường LSAs và nuôi cấy trong tối trong từ hai đến ba ngày. Sau đó, khoảng từ 20 đến 25 phôi mỗi đĩa petri được chuyển vào môi trường LSDc được bổ sung xefotaxim (250 mg/l) và bạc nitrat (1,6 mg/l) và được nuôi cấy trong tối ở khoảng 28°C trong 10 ngày.

Các phôi chưa trưởng thành, tạo ra các thể sản phôi được chuyển vào môi trường LSD1M0.5S. Mẻ nuôi cấy được chọn trên môi trường này trong khoảng 6 tuần với bước nuôi cấy phụ ở khoảng 3 tuần. Thể sản sống sót được chuyển sang môi trường Reg1 được bổ sung manozơ. Sau khi nuôi cấy trong sáng (chế độ 16 giờ sáng/ 8 giờ tối), sau đó mô màu xanh được chuyển vào môi trường Reg2 không có chất điều hòa sinh trưởng và được ủ trong khoảng 1-2 tuần. Cây non được chuyển sang hộp

Magenta GA-7 (Magenta Corp, Chicago Ill.) chứa môi trường Reg3 và nuôi trong sáng. Sau khoảng 2-3 tuần, cây trồng được thử nghiệm về sự có mặt của gen PMI và gen *cryBt* bằng PCR. Cây dương tính từ thử nghiệm PCR được chuyển vào nhà kính để đánh giá thêm.

Cây trồng chuyển gen từ 14 biến cố độc lập được đánh giá về số lượng bản sao (được xác định bằng phân tích Taqman), mức độ biểu hiện protein (được xác định bằng ELISA), và hiệu lực chống lại các loài côn trùng được quan tâm trong các thử nghiệm sinh học cắt lá. Cụ thể là, mô cây trồng được cắt từ các biến cố bản sao đơn lẻ (giai đoạn V3-V4) và được gây nhiễm bằng ấu trùng sơ sinh của loài gây hại đích, sau đó được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng 5 ngày. Các bản lá từ cây trồng chuyển gen biểu hiện BT-0032 được thử nghiệm chống lại sâu đục thân ngô Châu Âu (*Ostrinia nubilalis*), sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*), sâu xanh mùa thu (*Spodoptera frugiperda*) và sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*).

Kết quả của thử nghiệm sinh học này xác nhận rằng cây trồng được biến nạp ổn định biểu hiện protein giống Cry2 BT-0032 trong khoảng 4,12 – 13,1 µg/ gfw có hoạt tính chống lại sâu đục trái trên cây ngô (*Helicoverpa zea*) và sâu ăn chồi thuốc lá (*Heliothis virescens*).

Viện dẫn đến danh mục trình tự nộp điện tử

Bản chính thức của danh mục trình tự được nộp theo hình thức điện tử thông qua EFS-Web dưới dạng danh mục trình tự định dạng ASCII có tên tệp là "80838-WO-REG-ORG-P-1_SeqList_ST25.txt", tạo ra ngày 7 tháng 7 năm 2015, và có kích thước 56 kilobyte và được nộp đồng thời với bản mô tả. Danh mục trình tự chứa trong tài liệu có định dạng ASCII này là một phần của bản mô tả và được kết hợp ở đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Tham khảo chéo các đơn liên quan

Đơn này yêu cầu hưởng quyền lợi của Đơn Mỹ Số 62/189,573, nộp ngày 7 tháng 7 năm 2015, mà được kết hợp bằng cách viện dẫn toàn bộ cho mọi mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Gen khảm có chứa vùng khởi động khác loại được liên kết có điều khiển với phân tử axit nucleic có chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry mà gây độc đối với loài gây hại là sâu bọ cánh vảy, trong đó trình tự nucleotit (a) mã hóa protein Cry có chứa trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 99% với SEQ ID NO:12, hoặc mảnh độc tố của nó; hoặc (b) là trình tự tổng hợp của (a) mà đã được tối ưu hóa bộ ba mã hóa để biểu hiện ở sinh vật chuyển gen.

2. Gen khảm theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit có chứa SEQ ID NO:3, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của nó.

3. Gen khảm theo điểm 1, trong đó protein Cry có chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:12, hoặc mảnh độc tố của nó.

4. Gen khảm theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit tổng hợp có chứa SEQ ID NO:6, hoặc mảnh mã hóa cho độc tố của nó.

5. Gen khảm theo điểm 1, trong đó vùng khởi động khác loại là vùng khởi động có thể biểu hiện ở thực vật.

6. Gen khảm theo điểm 5, trong đó vùng khởi động có thể biểu hiện ở thực vật được chọn từ nhóm bao gồm các vùng khởi động của ubiquitin, virus cestrum vàng, TrpA ở ngô, OsMADS 6, H3 histon ở ngô, sucroza synthetaza 1 ở ngô, rượu dehydrogenaza 1 ở ngô, protein sốc nhiệt ở ngô, mtl ngô, RuBP carboxylaza tiểu đơn vị nhỏ ở đậu Hà Lan, actin ở lúa, xyclophilin ở lúa, mannopin syntaza plasmit Ti, nopalin syntaza plasmit Ti, chancon isomeraza ở dạ yên thảo, protein giàu glyxin 1 ở đậu, patatin ở khoai tây, lectin, vùng khởi động RuBP carboxylaza tiểu đơn vị nhỏ CaMV 35S và S-E9.

7. Protein Cry được mã hóa bởi gen khảm theo điểm 1, trong đó protein Cry có chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:15.

8. Chế phẩm diệt côn trùng có chứa protein Cry theo điểm 7 và chất mang nông dụng.

9. Vector tái tổ hợp có chứa gen khảm theo điểm 1.

10. Tế bào vi khuẩn hoặc tế bào thực vật chuyển gen có chứa vector tái tổ hợp theo điểm 9.

11. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 10, trong đó tế bào thực vật là a) tế bào cây hai lá mầm; hoặc b) tế bào cây một lá mầm; hoặc c) tế bào cây hai lá mầm được chọn từ nhóm gồm có tế bào đậu tương, tế bào hướng dương, tế bào cà chua, tế bào rau họ cải, tế bào cây bông, tế bào củ cải đường và tế bào cây thuốc lá; hoặc d) tế bào cây một lá mầm được chọn từ nhóm gồm có tế bào lúa mạch, tế bào ngô, tế bào yến mạch, tế bào lúa, tế bào cao lương, tế bào mía và tế bào lúa mì.

12. Cây trồng chuyển gen có chứa tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 11, trong đó cây trồng này là a) cây hai lá mầm; hoặc b) cây một lá mầm; hoặc c) cây hai lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm cây đậu tương, cây hướng dương, cây cà chua, cây rau họ cải, cây bông, cây củ cải đường và cây thuốc lá; hoặc d) cây một lá mầm được chọn từ nhóm bao gồm cây lúa mạch, cây ngô, cây yến mạch, cây lúa, cây cao lương, cây mía và cây lúa mì.

13. Hạt chuyển gen của cây trồng chuyển gen theo điểm 12, trong đó hạt này chứa gen khảm.

14. Sản phẩm thu hoạch có nguồn gốc từ cây trồng chuyển gen theo điểm 12, trong đó sản phẩm thu hoạch có chứa gen khảm.

15. Phương pháp tạo ra cây trồng chuyển gen kháng côn trùng, bao gồm bước đưa gen khảm theo điểm 1 vào cây trồng, trong đó protein Cry được biểu hiện trong cây trồng, bằng cách đó tạo ra cây trồng chuyển gen kháng côn trùng.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó bước đưa vào đạt được bằng cách a) biến nạp cây trồng; hoặc b) lai cây trồng thứ nhất có chứa gen khảm với cây trồng thứ hai khác.

17. Phương pháp theo điểm 16 trong đó cây trồng là cây ngô.

18. Phương pháp kiểm soát loài gây hại là sâu bọ cánh vảy bao gồm bước phân phối cho loài gây hại là sâu bọ cánh vảy hoặc môi trường của chúng chế phẩm có chứa lượng hữu hiệu của protein Cry theo điểm 7.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Syngenta Participations AG
 Bramlett, Matt
 Seguin, Katie
 Rose, Mark
 Kramer, Vance

<120> GEN KHẢM CÓ CHỨA VÙNG KHỞI ĐỘNG KHÁC LOẠI, PROTEIN CRY ĐƯỢC MÃ HÓA BỞI GEN KHẢM, CHẾ PHẨM DIỆT CÔN TRÙNG CÓ CHỨA PROTEIN CRY NÀY, CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CÂY TRỒNG CHUYỂN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT LOÀI GÂY HẠI LÀ SÂU BỌ CÁNH VÂY

<130> 80838-WO-REG-ORG-P-1

<150> 62/189,573
 <151> 2015-07-07

<160> 17

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 1875
 <212> ADN
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 1
 atgaataatg tattgaatag cgaaagacct actaagtgtg atgcgtataa cgtagtggct
 60
 catgatccat ttagttttga acataaatca gtagatacca tacaaaaaga atgggtggag
 120
 tggaaaagaa ccgatcatag tttatacgta tctcctattg tgggaactat agctaagttt
 180
 ctgctaaaga aaataggggg acttattgga aaaaggatat taagtgagtt aaagaattta
 240
 atttttccta gtggtagtag agcgtcaatg caagatatatt taagaggagc agaacaattt
 300
 tttaatcaaa gacttgatga agacaccttt gctcgtgtag aggcagaatt gagagggtt
 360
 caagcaaatg tagaggaatt taatcgacaa gtggacaatt ttttaaacc aaatcaaacc
 420
 cctgttcctt tagcgataat cgattcgggt aatacattgc aacaattatt ctttaagtaga
 480
 ttaccccagt tccagataga acgctatcag ctattattat tacctttatt tgcacaagca
 540

gctaattttac atcttacttt tattcgagat gttattctta atgcagatga atggggaata
600

ccagaagcaa cgggtgcgcac atatagacag cacctacaaa gatatacaca ggattactcc
660

aattattgta taaatacgta ccaaactgct ttccgggggtt taaacactcg tttacatgat
720

atggttagagt ttagaacatt tatgttttta aatgtattag actatgtatc catctgggtcg
780

ttgttttaa atcaaagtct gatggttact tcaactgcca atttatatgc ttcgggaagt
840

ggcagtaatc aatttttcac tgcacaagcc tggccatttt tatattccct cttccaggtt
900

aattcaaatt atataatgtc taattttggt ggtaaccgag agactgctac tgctgggtgtt
960

cctgggttag ggggattttt attcaatttt ttatttagtt ttaggggttaa ttatactgga
1020

ggagtttcat ctggtctcct aggtgttgag ggaattttta acaactttag ttgcaactcc
1080

tctttatcaa caccaattgt aagaagttgg ctggattcag gtatagaacg aagcgatatt
1140

caacataatt ggcgtacaga tatgtttctg agggctaatt gtgtaccttg tgggtgctttt
1200

ccattaactc ttgttatgta tccaaatgtg acaatgaatt attttctga ttatttcatt
1260

cgtaacattt ccggaattat tcaaaatatt gataacatga atttgagtag accattacac
1320

tttaatgaag taagagattt aagaggcaat gaagttgcta ctttggtatc tgtgcatagt
1380

acaaaaaata atatctatgc tgcccatgaa aatgggtacta tgattcattt ggcaccggaa
1440

gattatacag gtttcacaat gtcaccaata catgcaactc aagtgaataa tcagactcga
1500

acgttttatt ctgaaaaatt tggaaatcaa ggtgattcct tgagatttga gcaaactaac
1560

acaaccgctc gttatacgtt tagagggaat ggtaataatt ataatcttta tttaagagta
1620

tcattctcaag gaaattccaa tattcgagtt actataaatg gtagaaatta tactgtttca
1680

aatgttaata ctactacaaa taatgatgga gtacttgata atgaagctcg tttttcagat
1740

attcttattg ggaatgtagt ggcaagtgct aataactaatg tacctttaga tataaatgtg
1800

acattttaaca ccggtacaaa atttgagctt atgaatatta tgtttggtgcc aactaatctt
1860

ctaccactgt attaa
1875

<210> 2
<211> 1896
<212> ADN
<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 2
atgaataatg tattaaatag cggaagaact accatttgtg atgggcataa cgtaatggct
60

caggatccct ttagttttca acataaatca ttagatacta tacaaaaaga atggacggaa
120

tggaagagag atgatcatag tttatatgta gctcctgttg ttggaactgt tgcaattttt
180

ctgctaaaga aattgggggg gttcgctgca aaaaggatat tgaatgggtt atgggattta
240

gtatttccta atgataatac caaactaatg caagatatatt taagagagac agaaaaattt
300

ctaaaccaaa gacttaatgc agacactctt tctcgagtaa atgcagaatt ggaggggctt
360

caaaaaaatg tagcggagtt taatagacaa gtggataatt ttttaaattcc taatcgaaac
420

ccgactcttt tatcaataac ttctccagtt aatacaatgc aacaattgtt cctaaataga
480

ttaacgcagt tccagttacg aggatacgag ctgttattat tacctttatt tgcacaagca
540

gccaatttac atctttcctt tattagggac gttattctga atgcagagga atgggggatt
600

tcagcagcaa cgttacgcac atatcgaggt tacctaaaag actatacaaa agaatactct
660

aattattgta taaatacgta tcaaaccgca tttaaaaagt taaatactcc tttacacgaa
720

atgtagagt ttagaacata tatgttttta aatgtatttg aatatgtatc catttggtca
780

ttgtttaagt atcagagtct tctggtatct tctggcgcaa atttatatgc tagtggtagt
840

gggccacagc agaaacaatc atttagcgcg cagaactggc cattttttata ttcccttttc
900

caagtgaatt ctaattatgt attaactggt tttagtgggt ttaggaattc tttaccatg
960

cctaataattg gtggtttccc cggttctact acaactcacg cattgtttag tgcgagggct
1020

aattatagtg gaggaatttc atctggtatc atagggatga ctaatagtaa tcacaacttt
1080

aattgtagca ccgcttcttt acaaacacca tatactagaa gttggctgga ttcaggtaga
1140

gatcaacatg ccattaatac ctttacagat tggcagacag aatgttttca aacaacttcg
1200

gattcctggt gtggtgcctt tgtccccgt ggtaatacga attatttccc agattatttt
1260

attcgtaata tttctggagt ttcttttagtt gtcgggaatg aagatttaag aagaccgtta
1320

cactataatg aaataagaaa tatagcaagt ccttccggaa ccctggtgg agggcgagct
1380

tatatggcat ctgtgcacaa cagaaaaaat aatatctatg ccgctcatga aaatggtact
1440

atgattcatt tggcgccgga tgataatata gggtttatta tatcgccgat acatgcaaca
1500

caagtaaata cgcagaatcg aacatttatt tccgagaaat ttggaaatca aggtgattcc
1560

ttacgatttg aacaaacaaa cacaacagct cgatacacat ttaggggaaa gggcaatagt
1620

tataatctgt atttaagagt atcatcttta ggaaattcca ctattcgagt tacgataaac
1680

ggtaaggttt atactgttcc aaatgttaat accactacaa ataatgatgg gggtattgat
1740

aatggatcac gtttttcaga tgtttacatc ggtaacgtag tagcaaatga taagacgaat
1800

gtaccgtag atataaatgt gacatttaat tctgggtactc aatttgagct tatgaatatt
1860

atgtgtattc caactaatat tacaccactt tatta
1896

<210> 3

<211> 1902

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 3

atgaatagtg tattgaatag cggaagaact actatttgtg atgcgtataa tgtagcggct
60

catgatccat ttagttttca acacaaatca ttagataccg tacaaaagga atggacggag
120

tggaaaaaaa ataatcatag tttataccta gatacctattg ttggaactgt ggctagtttt
180

ctgttaaaga aagtggggag tcttggttga aaaaggatac taagtgagtt acggaattta
240

atatttccta gtggtagtag aaatctaata caagatattt taaggagagac agaacaattc
300

ctaaatcaaa gacttaatac agataccctt gctcgtgtaa atgcagaatt gatagggctc
360

caagcgaata taaggagagtt taatcaacaa gtagataatt ttttaaacc tactcaaaac
420

cctgttcctt tatcaataac ttcttcgggt aatacaatgc agcaattatt tctaaataga
480

ttaccccagt tccagatata aggataccaa ctgttattat tacctttatt tgcacaggca
540

gccaatctac atctttcttt tattagagat gttattctta atgcagatga atgggggtatt
600

tcagcagcaa cattacgtac gtatcgagat tacctgagaa attatacaag agattattct
660

aattattgta taaatacgt tcaaactgcg tttagagggt taaacacccg ttacacgat
720

atgttagaat ttagaacata tatgttttta aatgtatttg aatatgtatc catttggtca
780

ttgttttaaat atcagagtct tatggtatct tccggtgcta atttatatgc aagtggtagt
840

ggaccacagc agaccaatc atttacttca caagactggc cattttttata ttctcttttc
900

caagttaatt cgaattatat attatctggg attagtggta ctaggctttc tattaccttc
960

cctaataattg gtggtttacc gggtagtact acaactcatt cattgaatag tgccaggggt
1020

aattatagcg gaggagtttc atctggtctc ataggggcca ctaatctcaa tcacaacttt
1080

aattgcagca cggtcctccc tcctttatca acaccatttg ttagaagttg gctggattca
1140

ggtacagatc gagagggcgt tgctacctct acgaattggc agacagaatc ctttcaaaca
1200

actttaagtt taaggtgtgg tgctttttca gcccggtggaa attcaaacta tttcccagat
1260

tattttatcc gtaatatctt tgggggttcct ttagttatta gaaacgaaga tctaacaaga
1320

ccgttacact ataaccaaata aagaaatata gaaagtcctt cgggaacacc tgggtggagca
1380

cgggcctatt tggatatctg gcataacaga aaaaataata tctatgccgc taatgaaaat
1440

ggtactatga tccatttggc gccagaagat tatacaggat ttactatatc gccataacat
1500

gccactcaag tgaataatca aactcgaaca tttatttctg aaaaatttgg aatcaagggt
1560

gattctttta gggttgaaca aaacaacacg acagctcggt atacgcttag agggaatgga
1620

aatagttaca atctttatct aagagtttct tcaataggaa attccactat tcgagttact
1680

ataaacggta gggatatata tgctacaaat gttaatacta ctacaaataa cgatggagtt
1740

aatgataatg gagcccgttt ttcagatatt aatatcggtg atatagtagc aagtagtaat
1800

tctgatgtac cattagatat aaatgtaaca ttaaactccg gtactcaatt tgatcttatg
1860

aatattatgc ttgtaccaac taatatttca ccactttatt aa
1902

<210> 4
<211> 1872
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của BT-0016

<400> 4
atgaacaatg tgctcaacag cgagcgccca acgaagtgcg acgcttaca cgtgggtcgcc
60

cacgatcctt tctcattcga gcataagtcc gtggacacta tccagaagga gtgggtcgag
120

tggaagagga ccgatcactc cctctacgtg agcccgatcg tcggcaccat tgccaagtgc
180

ctcctgaaga agatcggtag cctgattggc aagcgcatcc tcagcgagct gaagaacctc
240

attttcccca gcgggtcgac ggcttcgatg caggacatcc tgaggggagc cgagcagttc
300

ctgaaccaga ggctcgacga ggatacttc gccagggtgg aggctgagct gaggggcctc
360

caggctaacg tggaggagtt caatcgccag gttgacaact tcctgaacct aatcagagc
420

ccggttcccc tcgcatcat tgattcagtg aacacactgc agcagctctt cctgtcccgg
480

ctcccgagc tccagatcca gcgctaccag ctgctcctcc tgccactctt cgctcaggct
540

gcgaacctcc acctgacatt cattcgggac gtcctcctga acgccgatga gtggggcatc
600

cctgaggcga cggttcgac atacaggcag catctccagc gctacacca ggactactcc
660

aactactgca tcaataacta ccagacggcg ttccgaggcc tgaacaccag gctccacgac
720

atgctggagt tcaggacatt catgttcttg aacgttctcg attacgtgag catctggtag
780

ctgttcaagt accagagcct catggtgacg tcgacagcca atctgtacgc gtctggctca
840

gggtccaacc agttcttcac ggcgcaggct tggccattcc tgtactccct cttccagggtg
900

aactctaatt acatcatgtc aaacttcggt ggcaacaggg agactgcgac ggccggcgctc
960

cctgggctcg gcgggttcct gttcaatttc ctcttcagct tcagggtgaa ctacaccggc
1020

gggggtctcca gcggcctcct ggggggtggag ggcattctga acaatttctc ctgcaactcg
1080

tctctcagca ctccaatcgt ccgctcgtgg ctggactctg gcattgagag gtcggatata
1140

cagcacaatt ggaggacgga catgttcctg agggccaacg gggtgccatg cggcgctttc
1200

cctctcacgc tggatcatgta cccaaacggt accatgaact acttcctga ctacttcata
1260

aggaatatatt ctggcatcat tcagaacata gataacatga atctgtcacg gccctccac
1320

ttcaatgagg tccgggacct gaggggcaac gaggttgcca ctctcgtctc tgttcattca
1380

accaagaaca atatctacgc tgcccacgag aacgggacta tgatccatct cgcgccggag
1440

gactacacgg gcttcacaat gtccccatt catgctaccc aggtcaacaa tcagacgcgg
1500

acattcatct cggagaagtt cgggaaccag ggcgattctc tgcgcttcga gcagacgaac
1560

accacggcca ggtacacatt ccggggcaat gggaacaatt acaacctcta cctgcgcggt
1620

tcattcccagg ggaactctaa tattcgcgtg actatcaacg gcaggaatta cacctccaac
1680

gtgaatacaa ctaccaacaa tgacggggtc ctcgataacg aggcgaggtt cagcgacata
1740

ctgattggca acgttggtgc ttcggccaac actaatgttc cgctggatat taacgtgacc
1800

ttcaatactg gcaccaagtt cgagctgatg aacatcatgt tcgtcccgac caacctcctg
1860

cccctgtact aa
1872

<210> 5
 <211> 1896
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của BT-0026.

<400> 5

atgaacaatg ttctgaattc cgggaggacc accatctgcg acggccacaa cgtgatggcc
 60

caggacccgt tctccttcca gcataagtcg ctcgacacca ttcagaagga gtggacggag
 120

tggaagaggg acgatcactc gctctacgtg gctccggtgg tgggcaccgt cgccatcttc
 180

ctcctgaaga agctcggcgg gttcgccgcg aagaggattc tcaacggcct gtgggacctc
 240

gtcttcccga acgataatac caagctcatg caggacatcc tgcgggagac ggagaagttc
 300

ctgaatcaga ggctcaacgc ggatacgtg tcgaggggtga acgctgagct ggagggcctc
 360

cagaagaacg ttgcggagtt caatcggcag gtggacaact tcctcaaccc gaatcgcaac
 420

cccactctcc tgtcaatcac ctccccagtc aatacgatgc agcagctctt cctgaaccgc
 480

ctcaccaggt tccagctgag gggctacgag ctgctgctcc tgcctctgtt cgctcaggct
 540

gccaacctcc atctgtcttt catccgcgac gtgattctca acgccgagga gtgggggatac
 600

tcagcggcta cactccggac ttaccgcggc tacctgaagg attacaccaa ggagtactcc
 660

aattactgca tcaacaccta ccagacggcc ttcaagaagc tgaacacacc actccacgag
 720

atgctggagt tcaggactta catgttcctc aacgtgttcg agtatgtgtc catctgggtcg
 780

ctgttcaagt accagagcct cctgggtctcc agcggcgcta acctctacgc ctcggggtcg
 840

ggccccgagc agaagcagtc tttctcagcc cagaactggc ccttcctgta ctccctcttc
 900

cagggttaata gcaactacgt gctgaccggg ttctctggct tccgcaattc attcacgatg
960

ccaacatcgt gtggcttccc tggctccaca actaccacg cgctcttctc ggctagggcc
1020

aactactctg gcgggatctc gtctgggatc attggcatga caaatagcaa ccataatttc
1080

aactgctcta ctgcgtcact ccagacaccg tacactcggc catggctgga ctccggccgc
1140

gatcagcacg ctatcaacac cttcacggac tggcagaccg agtgcttcca gacgacatcc
1200

gattcgtggt gcggggcttt cgtccccagg ggcaatacga actacttccc cgactacttc
1260

atcaggaata tttccggggg gagcctggtt gtgggcaacg aggatctccg caggccccctg
1320

cattacaatg agatccgcaa cattgcgtcc ccgtctggca cccctggcgg gggccgcgcg
1380

tacatggctt cgggtccaca caggaagaac aatatctacg ccgcgcacga gaacggcaca
1440

atgattcatc tcgccccaga cgataacacg ggcttcatca tttctcctat ccacgcgaca
1500

caagtgaata ctcagaaccg gaccttcatt tcagagaagt tcgggaacca gggcgactcc
1560

ctgcgcttcg agcagacaaa cactaccgcc aggtacactt tccgggggaa gggcaatagc
1620

tacaacctct acctgagggg ctcatccctc gggaattcga cgatccgggt tacaattaac
1680

ggcaagggtg acaccgtccc aaatgttaac acgacaacta acaatgacgg cgtgatcgat
1740

aacggctcgc gcttctctga cgtctacatt ggcaatgtcg ttgcgaacga caagacgaat
1800

gtccctcttg atatcaacgt tacattcaat agcggcactc agttcgagct gatgaacatc
1860

atgtgcattc cgaccaacat tacgcccctg tactaa
1896

<210> 6

<211> 1899

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của BT-0032.

<400> 6

atgaactcgg ttctgaatag cgggaggacg acgatttgcg atgcctacaa tgttgcgggc
60

cacgaccct tctctttcca gcacaagtct ctcgacacag tccagaagga gtggactgag
120

tggaagaaga acaatcactc cctctacctc gacccgatcg ttggcaccgt ggcctcattc
180

ctcctgaaga aggtcggctc cctggtcggc aagcgcatcc tcagcgagct gcgcaacctc
240

atthttcccgt ccggcagcac aaatctcatg caggacatcc tgcgcgagac tgagcagttc
300

ctgaaccaga ggctcaatac agatactctc gcgcgggtta acgtgagct gatcggcctc
360

caggcgaaca ttagggagtt caatcagcag gtggacaact tcctcaatcc aaccagaac
420

ccagttcctc tgagcatcac ctccagcgtg aacacgatgc agcagctctt cctgaatagg
480

ctccccagt tccagattca gggctaccag ctctgtctcc tgccactgtt cgctcaggcc
540

gcgaacctcc acctgagctt catccgggac gtgattctga acgcggatga gtggggcatc
600

tcggctgcca cactccgcac ttacagggac tacctgcgga actacacgcg cgattacagc
660

aactactgca tcaataccta ccagacggcc ttccgcggcc tgaacaccag gctccatgac
720

atgctggagt tccgcacgta catgttctc aacgttttcg agtatgtgtc catctggctg
780

ctcttcaagt accagtcctt gatggtctcg tctggcgcta acctgtacgc ttcgggctct
840

gggcctcagc agaccagtc ttacacgtca caggactggc cgttctctga ctctctcttc
900

caggtgaact caaattacat cctctccggc attagcggga cagcctgtc aatcactttc
960

ccaaacattg gcgggctccc aggtccacc acgacacact cgctgaactc tgccagggtc
1020

aattactccg gcgggggttc atccggcctc atcggggcga ccaacctgaa tcataacttc
1080

aattgctcga ccgtcctgcc accactctct acgccattcg ttcgctcatg gctcgactcc
1140

ggcacagata gggagggggg cgctaccage acgaactggc agactgagtc cttccagact
1200

accctcagcc tgcgctgcgg cgctttcagc gctaggggga actcgaatta cttcccggac
1260

tacttcatcc ggaacatttc cggcgtcccc ctggttatca ggaacgagga tctcacacgg
1320

ccactgcact acaaccagat ccgcaatatt gagtcaccat ccggcacgcc cggcggcgcc
1380

agggcttacc tcgtgagcgt ccataaccgc aagaacaata tctacgcggc taacgagaat
1440

ggcaccatga ttcacctggc gccagaggac tacacagggt tctactatct gcctattcat
1500

gctacgcagg tcaacaatca gacaaggact ttcattctcg agaagttcgg caaccagggg
1560

gattctctcc ggttcgagca gaacaatacg acagccaggt acaccctgcg gggcaacggg
1620

aattcttaca acctctacct gcgcgtgtcc tccatcggca actcaacaat ccgcgtgact
1680

attaatggga gggcttacac cgcgacgaac gttaatacta ccacgaacaa tgacggcgtg
1740

aacgataatg gggctaggtt cagcgacatc aacattggca atatcgtcgc ctcttcaaac
1800

agcgacgtgc cgctcgatat taacgtcacc ctgaattcgg gcacgcagtt cgatctcatg
1860

aacatcatgc tggtgccaac caatatttcc cctctctac
1899

<210> 7

<211> 1872

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của BT-0016 đột biến

<400> 7

atgaacaatg tgctcaacag cgagcgccca accaagtgcg acgcttaca cgtggctcgcc
60

cacgatcctt tctcattcga gcataagtcc gtggacacta tccagaagga gtgggtcgag
120

tggaagagga ccgatcactc cctctacgtg agcccgatcg tcggcaccat tgccaagttc
180

ctcctgaaga agatcggtgg cctgattggc aagcgcatcc tcagcgagct gaagaacctc
240

atthttccca gcgggtcgac ggcttcgatg caggacatcc tgaggggagc cgagcagttc
300

ctgaaccaga ggctcgacga ggatacttc gccaggggtg aggtgagct gaggggcctc
360

caggctaacg tggaggagtt caatcgccag gttgacaact tcctgaaccc aatcagacg
420

ccggttcccc tcgcatcat tgattcagt aacacactgc agcagctctt cctgtcccgg
480

ctcccgagc tccagatcca gcgctaccag ctgctcctcc tgccactctt cgctcaggct
540

gcgaacctcc acctgacatt cattcgggac gtcactctga acgccgatga gtggggcatc
600

cctgaggcga cggttcgac atacaggcag catctccagc gctacacca ggactactcc
660

aactactgca tcaatactta ccagacggcg ttccgaggcc tgaacaccag gctccacgac
720

atgctggagt tcaggacatt catgttcctg aacgttctcg attacgtgag catctggctg
780

ctgttcaagt accagagcct catggtgacg tcgacagcca atctgtacgc gtctggctca
840

gggtccaacc agttcttcac ggcgcaggct tggccattcc tgtactccct cttccagggtg
900

aactctaatt acatcatgtc aaacttcggt ggcaacaggg agactgagc ggccggcgtc
960

cctgggctcg gcgggttcct gttcaatttc ctcttcagct tcagggtgaa ctacaccggc
1020

ggggtctcca gcggcctcct gggggtggag ggcattctga acaatttctc ctgcaactcg
1080

tctctcagca ctccaatcgt ccgctcgtgg ctggactctg gcattgagag gtcggatata
1140

cagcacaatt ggaggacgga catgttcctg agggccaacg gggtgccatg cggcgctttc
1200

cctctcacgc tggatcatgta cccaaacggt accatgaact acttcctga ctacttcac
1260

aggaatatatt ctggcatcat tcagaacatc gataacatga atctgtcacg gccctccac
1320

ttcaatgagg tccgggacct gaggggcaac gaggttgcca ctctcgtctc tgttcattca
1380

accaagaaca atatctacgc tgcccacgag aacgggacta tgatccatct cgcgccggag
1440

gactacacgg gcttcacaat gtccccatt catgctaccc aggtcaacaa tcagacgcgg
1500

acattcatct cggagaagtt cgggaaccag ggcgattctc tgcgcttcga gcagacgaac
1560

accacggcca ggtacacatt ccggggcaat ggaacaatt acaacctcta cctgcgcgtt
1620

tcattcccagg ggaactctaa tattcgctg actatcaacg gcaggaatta cacctccaac
1680

gtgaatacaa ctaccaacaa tgacggggtc ctcgataacg aggcgagggt cagcgacatc
1740

ctgattggca acgttggtggc ttccggccaac actaatgttc cgctggatat taacgtgacc
1800

ttcaatactg gaaccaagtt cgagctgatg aacctcatgt tcgtcccgac caacatcctg
1860

cccctgtact aa
1872

<210> 8

<211> 1896

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của BT-0026 đột biến.

<400> 8

atgaacaatg ttctgaattc cgggaggacc accatctgcg acggccacaa cgtgatggcc
 60
 caggacccgt tctccttcca gcataagtcg ctcgacacca ttcagaagga gtggacggag
 120
 tggaagaggg acgatcactc gctctacgtg gctccggtgg tgggcaccgt cgccatcttc
 180
 ctctgaaga agctcggcgg gttcgccgcg aagaggattc tcaacggcct gtgggacctc
 240
 gtcttcccga acgataatac caagctcatg caggacatcc tgcgggagac ggagaagttc
 300
 ctgaatcaga ggctcaacgc ggatacgctg tcgaggggtga acgctgagct ggagggcctc
 360
 cagaagaacg ttgcggagtt caatcggcag gtggacaact tcctcaaccc gaatcgcaac
 420
 cccactctcc tgtcaatcac ctccccagtc aatacgatgc agcagctctt cctgaaccgc
 480
 ctcacccagt tccagctgag gggctacgag ctgctgctcc tgcctctgtt cgctcaggct
 540
 gccaacctcc atctgtcttt catccgcgac gtgattctca acgccgagga gtgggggac
 600
 tcagcggcta cactccggac ttaccgcggc tacctgaagg attacaccaa ggagtactcc
 660
 aattactgca tcaacaccta ccagacggcc ttcaagaagc tgaacacacc actccacgag
 720
 atgctggagt tcaggacata catgttcctc aacgtgttcg agtatgtgtc catctggctg
 780
 ctgttcaagt accagagcct cctgggtctc agcggcgcta acctctacgc ctcggggtcg
 840
 ggcccgcagc agaagcagtc tttctcagcc cagaactggc ccttcctgta ctccctcttc
 900
 cagggttaata gcaactacgt gctgaccggg ttctctgggt tccgcaattc attcacgatg
 960
 ccaaacatcg gtggcttccc tggetccaca actaccacg cgctcttctc ggctagggcc
 1020
 aactactctg gcgggatctc gtctgggatc attggcatga caaatagcaa ccataatttc
 1080

aactgctcta ctgcgtcact ccagacaccg tacactcggg catggctgga ctccggccgc
1140

gatcagcacg caatcaacac cttcacggac tggcagaccg agtgcttcca gacgacatcc
1200

gattcgtggg gcggggcttt cgtccccagg ggcaatacga actacttccc cgactacttc
1260

atcaggaata tttccggggg gagcctgggt gtgggcaacg aggatctccg caggccccctg
1320

cattacaatg agatccgcaa cattgcgtcc ccgtctggca cccctggcgg gggccgcgca
1380

tacatggctt cgggccacaa caggaagaac aatatctacg ccgcgcacga gaacggcaca
1440

atgattcatc tcgccccaga cgataaacag ggcttcatca tttctcctat ccacgcgaca
1500

caagtgaata ctcagaaccg gaccttcatt tcagagaagt tcgggaacca gggcgactcc
1560

ctgcgcttcg agcagacaaa cactaccgcc aggtacactt tccgggggaa gggcaatagc
1620

tacaacctct acctgagggt ctcattccctc ggggaattcga cgatccgggt tacaattaac
1680

ggcaaggtgt acaccgtccc aaatgttaac acgacaacta acaatgacgg cgtgatcgat
1740

aacggctcgc gcttctctga cgtctacatt ggcaatgtcg ttgcgaacga caagacgaat
1800

gtccctctgg atctcaacgt tacattcaat agcggcactc agttcgagct gatgaacctc
1860

atgtgcattc caaccaacat tacgcccctg tactaa
1896

<210> 9

<211> 1902

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Phiên bản được tối ưu hóa bộ ba mã hóa của BT-0032 đột biến.

<400> 9

atgaactcgg ttctgaatag cgggaggacg acgatttgcg atgcctacaa tgttgcgggc
60

cacgaccct tctctttcca gcacaagtct ctcgacacag tccagaagga gtggactgag
120

tggaagaaga acaatcactc cctctacctc gacccgatcg ttggcaccgt ggccctattc
180

ctcctgaaga aggtcggctc cctggtcggc aagcgcattc tcagcgagct gcgcaacctc
240

atcttcccgt ccggcagcac aaatctcatg caggacatcc tgcgcgagac tgagcagttc
300

ctgaaccaga ggctcaatac agatactctc gcgcgggtta acgctgagct gatcggcctc
360

caggcgaaca ttagggagtt caatcagcag gtggacaact tcctcaatcc aaccagaac
420

ccagttcctc tgagcatcac ctccagcgtg aacacgatgc agcagctctt cctgaatagg
480

ctccccagt tccagattca gggctaccag ctctgctcc tgccactgtt cgctcaggcc
540

gcgaacctcc acctgagctt catccgggac gtgattctga acgcggatga gtggggcatc
600

tcggctgcca cactccgcac ttacaggac tacctgcgga actacacgcg cgattacagc
660

aactactgca tcaataccta ccagacggcc ttccgcggcc tgaacaccag gctccatgac
720

atgctggagt tccgcacata catgttctc aacgttttcg agtatgtgtc catctggctg
780

ctcttcaagt accagtcctt gatggtctcg tctggcgcta acctgtacgc ttcgggctct
840

gggcctcagc agaccagtc ttacacgtca caggactggc cgttcctgta ctctctctc
900

cagggtgaact caaattacat cctctccggc attagcggga cagcctgtc aatcactttc
960

ccaaacattg gcgggctccc aggtccacc acgacacact cgctgaactc tgccagggtc
1020

aattactccg gcggggtttc atccggcctc atcggggcga ccaacctgaa tcataacttc
1080

aattgctcga ccgtcctgcc accactctct acgccattcg ttcgctcatg gctcgactcc
1140

ggcacagata gggagggggt cgctaccagc acgaactggc agactgagtc cttccagact
1200

accctcagcc tgcgctgcgg cgcttttcagc gctaggggga actcgaatta cttcccggac
1260

tacttcatcc ggaacatttc cggcgtcccc ctggttatca ggaacgagga tctcacacgg
1320

ccactgcact acaaccagat ccgcaatatt gagtcaccat ccggcacgcc cggcggcgcc
1380

agggccttacc tcgtgagcgt ccataaccgc aagaacaata tctacgcggc taacgagaat
1440

ggcaccatga ttcacctggc gccagaggac tacacagggc tcactatctc gcctattcat
1500

gctacgcagg tcaacaatca gacaaggact ttcattctcg agaagttcgg caaccagggg
1560

gattctctcc ggctcgagca gaacaatacg acagccaggt acacctgcg gggcaacggg
1620

aattcttaca acctctacct gcgcgtgtcc tccatcggca actcaacaat ccgcgtgact
1680

attaatggga gggcttacac cgcgacgaac gttaatacta ccacgaacaa tgacggcgtg
1740

aacgataatg gggctagggt cagcgacatc aacattggca atctcgtcgc ctcttcaaac
1800

agcgacgtgc cgctcgatat taacgtcacc ctgaattcgg gcacgcagtt cgatatcatg
1860

aacatcatgc tggtgccaac caatatttcc cctctctact ag
1902

<210> 10

<211> 623

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 10

Met	Asn	Asn	Val	Leu	Asn	Ser	Glu	Arg	Pro	Thr	Lys	Cys	Asp	Ala	Tyr
1				5					10					15	

Asn	Val	Val	Ala	His	Asp	Pro	Phe	Ser	Phe	Glu	His	Lys	Ser	Val	Asp
			20					25					30		

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

Ser Ile Trp Ser Leu Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Met Val Thr Ser Thr
260 265 270

Ala Asn Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Ser Asn Gln Phe Phe Thr Ala
275 280 285

Gln Ala Trp Pro Phe Leu Tyr Ser Leu Phe Gln Val Asn Ser Asn Tyr
290 295 300

Ile Met Ser Asn Phe Gly Gly Asn Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gly Val
305 310 315 320

Pro Gly Leu Gly Gly Phe Leu Phe Asn Phe Leu Phe Ser Phe Arg Val
325 330 335

Asn Tyr Thr Gly Gly Val Ser Ser Gly Leu Leu Gly Val Glu Gly Ile
340 345 350

Leu Asn Asn Phe Ser Cys Asn Ser Ser Leu Ser Thr Pro Ile Val Arg
355 360 365

Ser Trp Leu Asp Ser Gly Ile Glu Arg Ser Asp Ile Gln His Asn Trp
370 375 380

Arg Thr Asp Met Phe Leu Arg Ala Asn Gly Val Pro Cys Gly Ala Phe
385 390 395 400

Pro Leu Thr Leu Val Met Tyr Pro Asn Val Thr Met Asn Tyr Phe Pro
405 410 415

Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Ile Ile Gln Asn Ile Asp Asn
420 425 430

Met Asn Leu Ser Arg Pro Leu His Phe Asn Glu Val Arg Asp Leu Arg
435 440 445

Gly Asn Glu Val Ala Thr Leu Val Ser Val His Ser Thr Lys Asn Asn
450 455 460

Ile Tyr Ala Ala His Glu Asn Gly Thr Met Ile His Leu Ala Pro Glu
465 470 475 480

Asp Tyr Thr Gly Phe Thr Met Ser Pro Ile His Ala Thr Gln Val Asn
485 490 495

Asn Gln Thr Arg Thr Phe Ile Ser Glu Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp
500 505 510

Ser Leu Arg Phe Glu Gln Thr Asn Thr Thr Ala Arg Tyr Thr Phe Arg
515 520 525

Gly Asn Gly Asn Asn Tyr Asn Leu Tyr Leu Arg Val Ser Ser Gln Gly
530 535 540

Asn Ser Asn Ile Arg Val Thr Ile Asn Gly Arg Asn Tyr Thr Ser Asn
545 550 555 560

Val Asn Thr Thr Thr Asn Asn Asp Gly Val Leu Asp Asn Glu Ala Arg
565 570 575

Phe Ser Asp Ile Leu Ile Gly Asn Val Val Ala Ser Ala Asn Thr Asn
580 585 590

Val Pro Leu Asp Ile Asn Val Thr Phe Asn Thr Gly Thr Lys Phe Glu
595 600 605

Leu Met Asn Ile Met Phe Val Pro Thr Asn Leu Leu Pro Leu Tyr
610 615 620

<210> 11
<211> 631
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 11

Met Asn Asn Val Leu Asn Ser Gly Arg Thr Thr Ile Cys Asp Gly His
1 5 10 15

Asn Val Met Ala Gln Asp Pro Phe Ser Phe Gln His Lys Ser Leu Asp
20 25 30

Thr Ile Gln Lys Glu Trp Thr Glu Trp Lys Arg Asp Asp His Ser Leu
35 40 45

Tyr Val Ala Pro Val Val Gly Thr Val Ala Ile Phe Leu Leu Lys Lys
 50 55 60

Leu Gly Gly Phe Ala Ala Lys Arg Ile Leu Asn Gly Leu Trp Asp Leu
 65 70 75 80

Val Phe Pro Asn Asp Asn Thr Lys Leu Met Gln Asp Ile Leu Arg Glu
 85 90 95

Thr Glu Lys Phe Leu Asn Gln Arg Leu Asn Ala Asp Thr Leu Ser Arg
 100 105 110

Val Asn Ala Glu Leu Glu Gly Leu Gln Lys Asn Val Ala Glu Phe Asn
 115 120 125

Arg Gln Val Asp Asn Phe Leu Asn Pro Asn Arg Asn Pro Thr Leu Leu
 130 135 140

Ser Ile Thr Ser Pro Val Asn Thr Met Gln Gln Leu Phe Leu Asn Arg
 145 150 155 160

Leu Thr Gln Phe Gln Leu Arg Gly Tyr Glu Leu Leu Leu Leu Pro Leu
 165 170 175

Phe Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Phe Ile Arg Asp Val Ile
 180 185 190

Leu Asn Ala Glu Glu Trp Gly Ile Ser Ala Ala Thr Leu Arg Thr Tyr
 195 200 205

Arg Gly Tyr Leu Lys Asp Tyr Thr Lys Glu Tyr Ser Asn Tyr Cys Ile
 210 215 220

Asn Thr Tyr Gln Thr Ala Phe Lys Lys Leu Asn Thr Pro Leu His Glu
 225 230 235 240

Met Leu Glu Phe Arg Thr Tyr Met Phe Leu Asn Val Phe Glu Tyr Val
 245 250 255

Ser Ile Trp Ser Leu Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Leu Val Ser Ser Gly

260	265	270
Ala Asn Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Pro Gln Gln Lys Gln Ser Phe		
275	280	285
Ser Ala Gln Asn Trp Pro Phe Leu Tyr Ser Leu Phe Gln Val Asn Ser		
290	295	300
Asn Tyr Val Leu Thr Gly Phe Ser Gly Phe Arg Asn Ser Phe Thr Met		
305	310	315
Pro Asn Ile Gly Gly Phe Pro Gly Ser Thr Thr Thr His Ala Leu Phe		
	325	330
Ser Ala Arg Ala Asn Tyr Ser Gly Gly Ile Ser Ser Gly Ile Ile Gly		
	340	345
Met Thr Asn Ser Asn His Asn Phe Asn Cys Ser Thr Ala Ser Leu Gln		
	355	360
Thr Pro Tyr Thr Arg Ser Trp Leu Asp Ser Gly Arg Asp Gln His Ala		
	370	375
Ile Asn Thr Phe Thr Asp Trp Gln Thr Glu Cys Phe Gln Thr Thr Ser		
385	390	395
Asp Ser Trp Cys Gly Ala Phe Val Pro Arg Gly Asn Thr Asn Tyr Phe		
	405	410
Pro Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Val Ser Leu Val Val Gly		
	420	425
Asn Glu Asp Leu Arg Arg Pro Leu His Tyr Asn Glu Ile Arg Asn Ile		
	435	440
Ala Ser Pro Ser Gly Thr Pro Gly Gly Gly Arg Ala Tyr Met Ala Ser		
	450	455
Val His Asn Arg Lys Asn Asn Ile Tyr Ala Ala His Glu Asn Gly Thr		
465	470	475
		480

Met Ile His Leu Ala Pro Asp Asp Asn Thr Gly Phe Ile Ile Ser Pro
 485 490 495

Ile His Ala Thr Gln Val Asn Thr Gln Asn Arg Thr Phe Ile Ser Glu
 500 505 510

Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp Ser Leu Arg Phe Glu Gln Thr Asn Thr
 515 520 525

Thr Ala Arg Tyr Thr Phe Arg Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Asn Leu Tyr
 530 535 540

Leu Arg Val Ser Ser Leu Gly Asn Ser Thr Ile Arg Val Thr Ile Asn
 545 550 555 560

Gly Lys Val Tyr Thr Val Pro Asn Val Asn Thr Thr Thr Asn Asn Asp
 565 570 575

Gly Val Ile Asp Asn Gly Ser Arg Phe Ser Asp Val Tyr Ile Gly Asn
 580 585 590

Val Val Ala Asn Asp Lys Thr Asn Val Pro Leu Asp Ile Asn Val Thr
 595 600 605

Phe Asn Ser Gly Thr Gln Phe Glu Leu Met Asn Ile Met Cys Ile Pro
 610 615 620

Thr Asn Ile Thr Pro Leu Tyr
 625 630

<210> 12
 <211> 633
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 12

Met Asn Ser Val Leu Asn Ser Gly Arg Thr Thr Ile Cys Asp Ala Tyr
 1 5 10 15

Asn Val Ala Ala His Asp Pro Phe Ser Phe Gln His Lys Ser Leu Asp
 20 25 30

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

Ser Ile Trp Ser Leu Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Met Val Ser Ser Gly
260 265 270

Ala Asn Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Pro Gln Gln Thr Gln Ser Phe
275 280 285

Thr Ser Gln Asp Trp Pro Phe Leu Tyr Ser Leu Phe Gln Val Asn Ser
290 295 300

Asn Tyr Ile Leu Ser Gly Ile Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Thr Phe
305 310 315 320

Pro Asn Ile Gly Gly Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr His Ser Leu Asn
325 330 335

Ser Ala Arg Val Asn Tyr Ser Gly Gly Val Ser Ser Gly Leu Ile Gly
340 345 350

Ala Thr Asn Leu Asn His Asn Phe Asn Cys Ser Thr Val Leu Pro Pro
355 360 365

Leu Ser Thr Pro Phe Val Arg Ser Trp Leu Asp Ser Gly Thr Asp Arg
370 375 380

Glu Gly Val Ala Thr Ser Thr Asn Trp Gln Thr Glu Ser Phe Gln Thr
385 390 395 400

Thr Leu Ser Leu Arg Cys Gly Ala Phe Ser Ala Arg Gly Asn Ser Asn
405 410 415

Tyr Phe Pro Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Val Pro Leu Val
420 425 430

Ile Arg Asn Glu Asp Leu Thr Arg Pro Leu His Tyr Asn Gln Ile Arg
435 440 445

Asn Ile Glu Ser Pro Ser Gly Thr Pro Gly Gly Ala Arg Ala Tyr Leu
450 455 460

Val Ser Val His Asn Arg Lys Asn Asn Ile Tyr Ala Ala Asn Glu Asn
465 470 475 480

Gly Thr Met Ile His Leu Ala Pro Glu Asp Tyr Thr Gly Phe Thr Ile
 485 490 495

Ser Pro Ile His Ala Thr Gln Val Asn Asn Gln Thr Arg Thr Phe Ile
 500 505 510

Ser Glu Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp Ser Leu Arg Phe Glu Gln Asn
 515 520 525

Asn Thr Thr Ala Arg Tyr Thr Leu Arg Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Asn
 530 535 540

Leu Tyr Leu Arg Val Ser Ser Ile Gly Asn Ser Thr Ile Arg Val Thr
 545 550 555 560

Ile Asn Gly Arg Val Tyr Thr Ala Thr Asn Val Asn Thr Thr Thr Asn
 565 570 575

Asn Asp Gly Val Asn Asp Asn Gly Ala Arg Phe Ser Asp Ile Asn Ile
 580 585 590

Gly Asn Ile Val Ala Ser Ser Asn Ser Asp Val Pro Leu Asp Ile Asn
 595 600 605

Val Thr Leu Asn Ser Gly Thr Gln Phe Asp Leu Met Asn Ile Met Leu
 610 615 620

Val Pro Thr Asn Ile Ser Pro Leu Tyr
 625 630

<210> 13
 <211> 623
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> BT-0016 đột biến

<400> 13

Met Asn Asn Val Leu Asn Ser Glu Arg Pro Thr Lys Cys Asp Ala Tyr
 1 5 10 15

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

Met Leu Glu Phe Arg Thr Phe Met Phe Leu Asn Val Leu Asp Tyr Val
 245 250 255

Ser Ile Trp Ser Leu Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Met Val Thr Ser Thr
 260 265 270

Ala Asn Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Ser Asn Gln Phe Phe Thr Ala
 275 280 285

Gln Ala Trp Pro Phe Leu Tyr Ser Leu Phe Gln Val Asn Ser Asn Tyr
 290 295 300

Ile Met Ser Asn Phe Gly Gly Asn Arg Glu Thr Ala Thr Ala Gly Val
 305 310 315 320

Pro Gly Leu Gly Gly Phe Leu Phe Asn Phe Leu Phe Ser Phe Arg Val
 325 330 335

Asn Tyr Thr Gly Gly Val Ser Ser Gly Leu Leu Gly Val Glu Gly Ile
 340 345 350

Leu Asn Asn Phe Ser Cys Asn Ser Ser Leu Ser Thr Pro Ile Val Arg
 355 360 365

Ser Trp Leu Asp Ser Gly Ile Glu Arg Ser Asp Ile Gln His Asn Trp
 370 375 380

Arg Thr Asp Met Phe Leu Arg Ala Asn Gly Val Pro Cys Gly Ala Phe
 385 390 395 400

Pro Leu Thr Leu Val Met Tyr Pro Asn Val Thr Met Asn Tyr Phe Pro
 405 410 415

Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Ile Ile Gln Asn Ile Asp Asn
 420 425 430

Met Asn Leu Ser Arg Pro Leu His Phe Asn Glu Val Arg Asp Leu Arg
 435 440 445

Gly Asn Glu Val Ala Thr Leu Val Ser Val His Ser Thr Lys Asn Asn

450 455 460
 Ile Tyr Ala Ala His Glu Asn Gly Thr Met Ile His Leu Ala Pro Glu
 465 470 475 480
 Asp Tyr Thr Gly Phe Thr Met Ser Pro Ile His Ala Thr Gln Val Asn
 485 490 495
 Asn Gln Thr Arg Thr Phe Ile Ser Glu Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp
 500 505 510
 Ser Leu Arg Phe Glu Gln Thr Asn Thr Thr Ala Arg Tyr Thr Phe Arg
 515 520 525
 Gly Asn Gly Asn Asn Tyr Asn Leu Tyr Leu Arg Val Ser Ser Gln Gly
 530 535 540
 Asn Ser Asn Ile Arg Val Thr Ile Asn Gly Arg Asn Tyr Thr Ser Asn
 545 550 555 560
 Val Asn Thr Thr Thr Asn Asn Asp Gly Val Leu Asp Asn Glu Ala Arg
 565 570 575
 Phe Ser Asp Ile Leu Ile Gly Asn Val Val Ala Ser Ala Asn Thr Asn
 580 585 590
 Val Pro Leu Asp Ile Asn Val Thr Phe Asn Thr Gly Thr Lys Phe Glu
 595 600 605
 Leu Met Asn Leu Met Phe Val Pro Thr Asn Ile Leu Pro Leu Tyr
 610 615 620

 <210> 14
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

 <220>
 <223> Protein BT-0026 đột biến.

 <400> 14
 Met Asn Asn Val Leu Asn Ser Gly Arg Thr Thr Ile Cys Asp Gly His
 1 5 10 15

Asn Val Met Ala Gln Asp Pro Phe Ser Phe Gln His Lys Ser Leu Asp
20 25 30

Thr Ile Gln Lys Glu Trp Thr Glu Trp Lys Arg Asp Asp His Ser Leu
35 40 45

Tyr Val Ala Pro Val Val Gly Thr Val Ala Ile Phe Leu Leu Lys Lys
50 55 60

Leu Gly Gly Phe Ala Ala Lys Arg Ile Leu Asn Gly Leu Trp Asp Leu
65 70 75 80

Val Phe Pro Asn Asp Asn Thr Lys Leu Met Gln Asp Ile Leu Arg Glu
85 90 95

Thr Glu Lys Phe Leu Asn Gln Arg Leu Asn Ala Asp Thr Leu Ser Arg
100 105 110

Val Asn Ala Glu Leu Glu Gly Leu Gln Lys Asn Val Ala Glu Phe Asn
115 120 125

Arg Gln Val Asp Asn Phe Leu Asn Pro Asn Arg Asn Pro Thr Leu Leu
130 135 140

Ser Ile Thr Ser Pro Val Asn Thr Met Gln Gln Leu Phe Leu Asn Arg
145 150 155 160

Leu Thr Gln Phe Gln Leu Arg Gly Tyr Glu Leu Leu Leu Leu Pro Leu
165 170 175

Phe Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Phe Ile Arg Asp Val Ile
180 185 190

Leu Asn Ala Glu Glu Trp Gly Ile Ser Ala Ala Thr Leu Arg Thr Tyr
195 200 205

Arg Gly Tyr Leu Lys Asp Tyr Thr Lys Glu Tyr Ser Asn Tyr Cys Ile
210 215 220

Asn Thr Tyr Gln Thr Ala Phe Lys Lys Leu Asn Thr Pro Leu His Glu

225		230		235		240									
Met	Leu	Glu	Phe	Arg	Thr	Tyr	Met	Phe	Leu	Asn	Val	Phe	Glu	Tyr	Val
				245					250					255	
Ser	Ile	Trp	Ser	Leu	Phe	Lys	Tyr	Gln	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Ser	Gly
			260					265					270		
Ala	Asn	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Gln	Gln	Lys	Gln	Ser	Phe
		275					280					285			
Ser	Ala	Gln	Asn	Trp	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Asn	Ser
	290					295					300				
Asn	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Phe	Ser	Gly	Phe	Arg	Asn	Ser	Phe	Thr	Met
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Gly	Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	His	Ala	Leu	Phe
				325					330					335	
Ser	Ala	Arg	Ala	Asn	Tyr	Ser	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Gly	Ile	Ile	Gly
			340					345					350		
Met	Thr	Asn	Ser	Asn	His	Asn	Phe	Asn	Cys	Ser	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln
		355					360					365			
Thr	Pro	Tyr	Thr	Arg	Ser	Trp	Leu	Asp	Ser	Gly	Arg	Asp	Gln	His	Ala
	370					375					380				
Ile	Asn	Thr	Phe	Thr	Asp	Trp	Gln	Thr	Glu	Cys	Phe	Gln	Thr	Thr	Ser
385					390					395					400
Asp	Ser	Trp	Cys	Gly	Ala	Phe	Val	Pro	Arg	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Phe
				405					410					415	
Pro	Asp	Tyr	Phe	Ile	Arg	Asn	Ile	Ser	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Val	Gly
			420					425					430		
Asn	Glu	Asp	Leu	Arg	Arg	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Glu	Ile	Arg	Asn	Ile
		435					440					445			

Ala Ser Pro Ser Gly Thr Pro Gly Gly Gly Arg Ala Tyr Met Ala Ser
 450 455 460

Val His Asn Arg Lys Asn Asn Ile Tyr Ala Ala His Glu Asn Gly Thr
 465 470 475 480

Met Ile His Leu Ala Pro Asp Asp Asn Thr Gly Phe Ile Ile Ser Pro
 485 490 495

Ile His Ala Thr Gln Val Asn Thr Gln Asn Arg Thr Phe Ile Ser Glu
 500 505 510

Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp Ser Leu Arg Phe Glu Gln Thr Asn Thr
 515 520 525

Thr Ala Arg Tyr Thr Phe Arg Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Asn Leu Tyr
 530 535 540

Leu Arg Val Ser Ser Leu Gly Asn Ser Thr Ile Arg Val Thr Ile Asn
 545 550 555 560

Gly Lys Val Tyr Thr Val Pro Asn Val Asn Thr Thr Thr Asn Asn Asp
 565 570 575

Gly Val Ile Asp Asn Gly Ser Arg Phe Ser Asp Val Tyr Ile Gly Asn
 580 585 590

Val Val Ala Asn Asp Lys Thr Asn Val Pro Leu Asp Leu Asn Val Thr
 595 600 605

Phe Asn Ser Gly Thr Gln Phe Glu Leu Met Asn Leu Met Cys Ile Pro
 610 615 620

Thr Asn Ile Thr Pro Leu Tyr
 625 630

<210> 15

<211> 633

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Protein BT-0032 đột biến.

<400> 15

Met Asn Ser Val Leu Asn Ser Gly Arg Thr Thr Ile Cys Asp Ala Tyr
 1 5 10 15

Asn Val Ala Ala His Asp Pro Phe Ser Phe Gln His Lys Ser Leu Asp
 20 25 30

Thr Val Gln Lys Glu Trp Thr Glu Trp Lys Lys Asn Asn His Ser Leu
 35 40 45

Tyr Leu Asp Pro Ile Val Gly Thr Val Ala Ser Phe Leu Leu Lys Lys
 50 55 60

Val Gly Ser Leu Val Gly Lys Arg Ile Leu Ser Glu Leu Arg Asn Leu
 65 70 75 80

Ile Phe Pro Ser Gly Ser Thr Asn Leu Met Gln Asp Ile Leu Arg Glu
 85 90 95

Thr Glu Gln Phe Leu Asn Gln Arg Leu Asn Thr Asp Thr Leu Ala Arg
 100 105 110

Val Asn Ala Glu Leu Ile Gly Leu Gln Ala Asn Ile Arg Glu Phe Asn
 115 120 125

Gln Gln Val Asp Asn Phe Leu Asn Pro Thr Gln Asn Pro Val Pro Leu
 130 135 140

Ser Ile Thr Ser Ser Val Asn Thr Met Gln Gln Leu Phe Leu Asn Arg
 145 150 155 160

Leu Pro Gln Phe Gln Ile Gln Gly Tyr Gln Leu Leu Leu Leu Pro Leu
 165 170 175

Phe Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Phe Ile Arg Asp Val Ile
 180 185 190

Leu Asn Ala Asp Glu Trp Gly Ile Ser Ala Ala Thr Leu Arg Thr Tyr
 195 200 205

Arg Asp Tyr Leu Arg Asn Tyr Thr Arg Asp Tyr Ser Asn Tyr Cys Ile
 210 215 220

Asn Thr Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Thr Arg Leu His Asp
 225 230 235 240

Met Leu Glu Phe Arg Thr Tyr Met Phe Leu Asn Val Phe Glu Tyr Val
 245 250 255

Ser Ile Trp Ser Leu Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Met Val Ser Ser Gly
 260 265 270

Ala Asn Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Pro Gln Gln Thr Gln Ser Phe
 275 280 285

Thr Ser Gln Asp Trp Pro Phe Leu Tyr Ser Leu Phe Gln Val Asn Ser
 290 295 300

Asn Tyr Ile Leu Ser Gly Ile Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Thr Phe
 305 310 315 320

Pro Asn Ile Gly Gly Leu Pro Gly Ser Thr Thr Thr His Ser Leu Asn
 325 330 335

Ser Ala Arg Val Asn Tyr Ser Gly Gly Val Ser Ser Gly Leu Ile Gly
 340 345 350

Ala Thr Asn Leu Asn His Asn Phe Asn Cys Ser Thr Val Leu Pro Pro
 355 360 365

Leu Ser Thr Pro Phe Val Arg Ser Trp Leu Asp Ser Gly Thr Asp Arg
 370 375 380

Glu Gly Val Ala Thr Ser Thr Asn Trp Gln Thr Glu Ser Phe Gln Thr
 385 390 395 400

Thr Leu Ser Leu Arg Cys Gly Ala Phe Ser Ala Arg Gly Asn Ser Asn
 405 410 415

Tyr Phe Pro Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Val Pro Leu Val
 420 425 430

Ile Arg Asn Glu Asp Leu Thr Arg Pro Leu His Tyr Asn Gln Ile Arg
 435 440 445

Asn Ile Glu Ser Pro Ser Gly Thr Pro Gly Gly Ala Arg Ala Tyr Leu
 450 455 460

Val Ser Val His Asn Arg Lys Asn Asn Ile Tyr Ala Ala Asn Glu Asn
 465 470 475 480

Gly Thr Met Ile His Leu Ala Pro Glu Asp Tyr Thr Gly Phe Thr Ile
 485 490 495

Ser Pro Ile His Ala Thr Gln Val Asn Asn Gln Thr Arg Thr Phe Ile
 500 505 510

Ser Glu Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp Ser Leu Arg Phe Glu Gln Asn
 515 520 525

Asn Thr Thr Ala Arg Tyr Thr Leu Arg Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Asn
 530 535 540

Leu Tyr Leu Arg Val Ser Ser Ile Gly Asn Ser Thr Ile Arg Val Thr
 545 550 555 560

Ile Asn Gly Arg Val Tyr Thr Ala Thr Asn Val Asn Thr Thr Thr Asn
 565 570 575

Asn Asp Gly Val Asn Asp Asn Gly Ala Arg Phe Ser Asp Ile Asn Ile
 580 585 590

Gly Asn Leu Val Ala Ser Ser Asn Ser Asp Val Pro Leu Asp Ile Asn
 595 600 605

Val Thr Leu Asn Ser Gly Thr Gln Phe Asp Ile Met Asn Ile Met Leu
 610 615 620

Val Pro Thr Asn Ile Ser Pro Leu Tyr
 625 630

<210> 16
 <211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi giống Cry2 xuôi với vị trí giới hạn tách dòng được bổ sung

<400> 16

gtttaaacat gaataatgta ttgaatagcg

30

<210> 17

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi giống Cry2 ngược với vị trí giới hạn tách dòng được bổ sung.

<400> 17

ggcgcgcctt aatacagtgg tagaagatta g

31

36