



(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)



1-0031813

(51)⁸ C12N 15/09; C12N 5/10; A01H 5/00

(13) B

(21) 1-2017-01807

(22) 16/12/2015

(86) PCT/KR2015/013812 16/12/2015

(87) WO2016/099153 23/06/2016

(30) 10-2014-0181791 16/12/2014 KR

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/11/2017 356A

(73) FARMHANNONG CO., LTD. (KR)

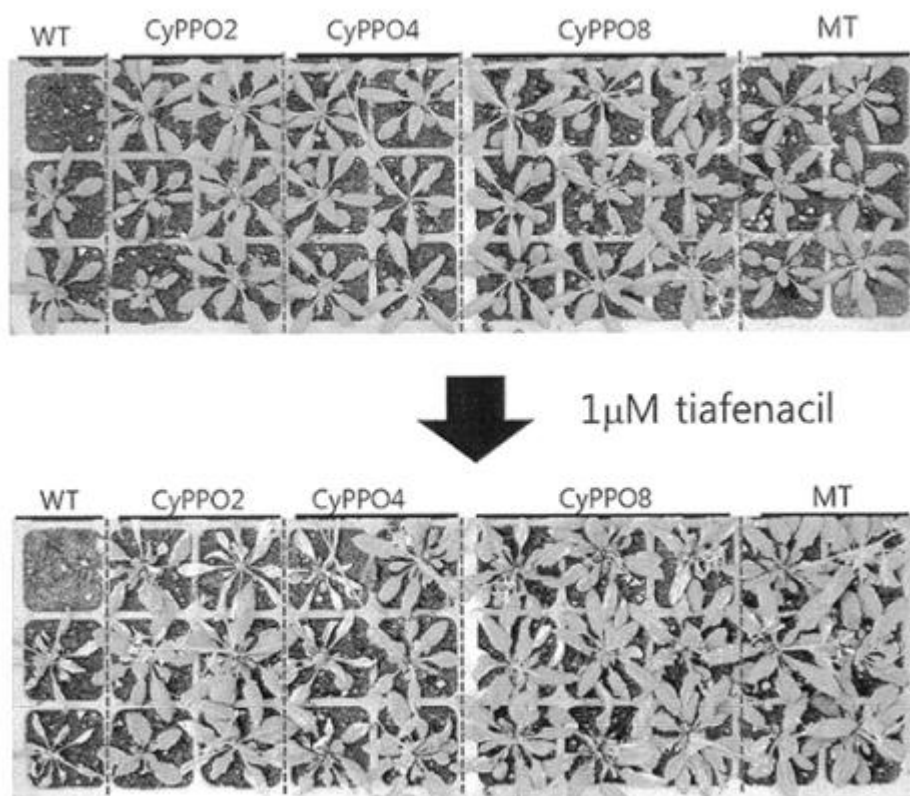
24, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07320, Republic of Korea

(72) SUNG, Soon-Kee (KR); YOON, Joonseon (KR); HAN, Yunjung (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO TÍNH KHÁNG CHẤT DIỆT CỎ CHO THỰC VẬT HOẶC TẢO, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT HOẶC TẢO CÓ TÍNH KHÁNG CHẤT DIỆT CỎ

(57) Sáng chế đề xuất chế phẩm tạo hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo; phương pháp tạo hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, bao gồm cây trồng nông nghiệp bằng cách chèn biến thể protoporphyrinogen oxidaza có nguồn gốc sinh vật nhân sơ vào thực vật hoặc tảo; và phương pháp sản xuất thực vật hoặc tảo có tính kháng chất diệt cỏ.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, bao gồm cây trồng nông nghiệp bằng cách chèn biến thể protoporphyrinogen oxidaza có nguồn gốc sinh vật nhân sơ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quá trình sinh tổng hợp porphyrin góp phần tổng hợp chất diệp lục và hem đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa ở thực vật, và quá trình này diễn ra trong lục lạp. Trong quá trình này, protoporphyrinogen IX oxidaza (sau đây gọi tắt là PPO; EC:1.3.3.4) xúc tác oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX. Sau khi oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX, protoporphyrin IX gắn kết với magie bởi Mg-chelatase để tổng hợp chất diệp lục, và protoporphyrin IX gắn kết với sắt bởi Fe-chelatase để tổng hợp hem.

Do đó, khi hoạt tính PPO bị ức chế, thì quá trình tổng hợp chất diệp lục và hem bị ức chế và cơ chất protoporphyrinogen IX không tham gia vào quá trình sinh tổng hợp porphyrin, dẫn đến việc bài xuất nhanh chóng protoporphyrinogen IX từ lục lạp vào bào tương, và sự tích tụ protoporphyrin IX ở bào tương gây ra bởi quá trình oxy hóa. Do đó, protoporphyrin IX tích tụ tạo ra oxy đơn bội phản ứng mạnh ($^1\text{O}_2$) trong sự có mặt của ánh sáng và oxy để phá hủy màng tế bào, và gây chết nhanh tế bào thực vật. Dựa trên nguyên lý này, chất diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO đã được phát triển. Cho đến nay, có 9 nhóm chất diệt cỏ, bao gồm pyrimidinon, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphthalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinon, và các chất diệt cỏ có cấu trúc khác, được phân loại theo cấu trúc hóa học của chúng.

Hơn nữa, khi sử dụng chất diệt cỏ, để ngăn ngừa tác dụng của các chất này đến sinh trưởng của cây trồng, cần tạo ra tính kháng chất diệt cỏ cho cây trồng.

Trong khi đó, tảo có khả năng quang hợp và chuyển hóa ánh sáng mặt trời thành năng lượng có thể được sử dụng để tổng hợp nhiều hợp chất hữu ích. Thông qua quá trình

quang hợp cố định cacbon, tạo có thể chuyển hóa CO₂ thành đường, tinh bột, lipid, chất béo, hoặc các hợp chất sinh học khác, nhờ đó loại bỏ được khí nhà kính khỏi môi trường không khí. Hơn nữa, quá trình nuôi trồng tảo trên quy mô lớn có thể được sử dụng để sản xuất nhiều hợp chất sinh học để sử dụng làm enzyme công nghiệp, dược chất và protein, chế phẩm dinh dưỡng, sản phẩm thương mại, hoặc sản phẩm nhiên liệu.

Nhược điểm chính của quá trình nuôi trồng tảo trên quy mô lớn trong thiết bị phản ứng sinh học hoặc bể kín hoặc bể hở là chúng có thể bị lây nhiễm bởi các loài tảo, vi nấm và vi khuẩn cạnh tranh không mong muốn khác, cũng như luân trùng và các động vật phù du khác ăn các loài tảo mong muốn trong quá trình nuôi trồng.

Do đó, cần tạo ra tính kháng chất diệt cỏ cho tảo để có thể sinh trưởng trong sự có mặt của chất diệt cỏ ở nồng độ làm giảm sinh trưởng của các sinh vật cạnh tranh không mang gen kháng chất diệt cỏ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đã biết rằng gen PPO loại hemY có nguồn gốc từ sinh vật nhân sơ có tính kháng chất diệt cỏ phổ rộng, bao gồm 9 loại chất diệt cỏ ức chế PPO. Ngoài ra, đã kiểm chứng được rằng gen này được biểu hiện ở thực vật hoặc tảo, và tạo ra tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo. Do đó, mục đích của sáng chế là đề cập đến phương pháp tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật, bao gồm cây trồng nông nghiệp hoặc tảo bằng cách chèn biến thể protoporphyrinogen oxidaza có nguồn gốc sinh vật nhân sơ vào thực vật hoặc tảo.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; và polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; và gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7.

Theo một phương án cụ thể, gen này có thể bao gồm gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.2 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit SEQ ID NO.2; gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.4 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit SEQ ID NO.4; gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.6 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit SEQ ID NO.6; hoặc gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.8 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự nucleotit SEQ ID NO.8.

Theo một phương án cụ thể khác, gen này có thể được chứa trong vectơ cat-xet tái tổ hợp biểu hiện gen thực vật hoặc vectơ cat-xet tái tổ hợp biểu hiện gen tảo.

Theo một phương án cụ thể khác, chất diệt cỏ có thể là chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

Theo một phương án cụ thể khác, chất diệt cỏ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphtalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidindion, và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác, chất diệt cỏ có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm butafenacil, saflufenacil, benzfendizon, tiafenacil, fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, acifluorfen, bifenox, ethoxyfen, lactofen, chlomethoxyfen, chlorintofen, floglycofen-etyl, halosafen, pyraflufen-etyl, fluazolat, flumioxazin,

cinidon-ethyl, flumiclorac-pentyl, fluthiacet, thidiazimin, oxadiargyl, oxadiazon, carfentrazon, sulfentrazon, azafenidin, pentoxazon, pyraclostrobin, flufenpyr-ethyl, proflumazone và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác, thực vật có thể là thực vật một lá mầm, thực vật hai lá mầm, thực vật thân thảo, và/hoặc thực vật thân gỗ.

Theo một phương án cụ thể khác, thực vật hoặc tảo có thể được thiết kế di truyền để còn chứa polypeptit thứ hai hoặc gen thứ hai mã hóa peptit tương ứng, nhờ đó có tính kháng chất diệt cỏ phổ rộng kháng lại chất diệt cỏ thứ hai.

Theo một phương án cụ thể khác, chất diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở chất diệt cỏ ức chế phân chia tế bào, chất diệt cỏ ức chế quang hợp, chất diệt cỏ ức chế tổng hợp axit amin, chất diệt cỏ ức chế lập thể, và chất diệt cỏ ức chế màng tế bào.

Theo một phương án cụ thể khác, chất diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở glyphosat, glufosinat, dicamba, axit 2,4-diclophenoxyaxetic, isoxaflutol, chất diệt cỏ ức chế acetolactat synthase, chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II, chất diệt cỏ phenylurea, chất diệt cỏ bromoxynil hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án cụ thể khác, polypeptit thứ hai tạo tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo có thể bao gồm peptit tạo tính kháng chất diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphat synthase, glyphosat oxidase, glyphosat-N-acetyltransferase, hoặc glyphosat decarboxylase kháng chất diệt cỏ glyphosat; phosphinothricin-N-acetyltransferase kháng chất diệt cỏ glufosinat; monooxygenase kháng chất diệt cỏ dicamba; axit 2,4-diclophenoxyaxetic monooxygenase hoặc aryloxyalkanoate dioxygenase kháng chất diệt cỏ axit 2,4-diclophenoxyaxetic; acetolactat synthase, axit acetohydroxy synthase, hoặc axit acetohydroxy synthase tiểu đơn vị mạch dài kháng chất diệt cỏ sulfonyleurea chất diệt cỏ ức chế acetolactat synthase; protein D1 hệ quang hóa II kháng chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; cytochrome P450 kháng chất diệt cỏ phenylurea; hydroxylphenylpyruvate dioxygenase kháng chất diệt cỏ ức chế lập thể; nitrilase kháng chất diệt cỏ bromoxynil; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Hơn nữa, gen mã hóa polypeptit thứ hai tạo tính kháng chất diệt cỏ có thể bao gồm một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm nucleotit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở gen CP4 EPSPS, EPSPS(AG), MEPSPS, 2MEPSPS, GOXV247, GAT4601, hoặc GAT4621 kháng chất diệt cỏ glyphosat; gen BAR, PAT, hoặc PAT(SYN) kháng chất diệt cỏ glufosinat; gen DMO kháng chất diệt cỏ dicamba; gen AAD-1 hoặc AAD-12 kháng chất diệt cỏ axit 2,4-diclophenoxyaxetic; ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, CSR1, CSR1-1, CSR1-2, SURA, hoặc SURB kháng chất diệt cỏ sulfonylurea chất diệt cỏ ức chế axetolactat synthaza; gen PSBA kháng chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; gen CYP76B1 kháng chất diệt cỏ phenylurea; gen HPPDPF W336 kháng chất diệt cỏ isoxaflutol; gen BXN kháng chất diệt cỏ bromoxynil; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến sinh vật cải biến gen có tính kháng chất diệt cỏ thể hệ mới và/hoặc tăng cường, hoặc sản phẩm tách dòng hoặc sinh vật thể hệ sau của nó, thể biến nạp hoặc sản phẩm tách dòng hoặc thể biến nạp thể hệ sau của nó biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7, hoặc gen mã hóa polypeptit này; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án cụ thể, đích để cải biến gen có thể là tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc thực vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật cải biến gen hoặc tảo cải biến gen có tính kháng chất diệt cỏ thể hệ mới và/hoặc tăng cường, bao gồm bước chuyển một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1, hoặc gen mã hóa polypeptit tương ứng này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ

tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3, hoặc gen mã hóa polypeptit tương ứng này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5, hoặc gen mã hóa polypeptit tương ứng này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7, hoặc gen mã hóa polypeptit tương ứng này; và hỗn hợp bất kỳ của chúng vào tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc thực vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo. Phương pháp này bao gồm bước chuyển một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng vào tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc thực vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ dại ở vùng đất trồng trọt. Phương pháp này bao gồm bước trồng ở vùng đất trồng trọt với thực vật cải biến gen chứa polypeptit hoặc gen được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc gen mã hóa polypeptit tương ứng này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự

axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7, hoặc gen mã hóa polypeptit này; và hỗn hợp bất kỳ của chúng, sau đó bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza lên vùng đất trồng trọt.

Theo một phương án cụ thể, bước bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào vùng đất trồng trọt có thể được thực hiện bằng cách bón kết hợp hai hoặc nhiều chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza ở lượng hữu hiệu của chúng, luân phiên hoặc đồng thời.

Theo một phương án cụ thể khác, thực vật có thể được cải biến gen để biểu hiện polypeptit thứ hai tạo tính kháng chất diệt cỏ hoặc gen mã hóa peptit tương ứng. Chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và chất diệt cỏ thứ hai, có thể được bón lên vùng đất trồng trọt ở lượng hữu hiệu của chúng, luân phiên hoặc đồng thời.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát loài thủy sinh không mong muốn trong môi trường canh tác. Phương pháp này bao gồm bước nuôi trồng trên môi trường canh tác với tảo cải biến gen chứa polypeptit hoặc gen được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc gen mã hóa polypeptit tương ứng này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5, hoặc gen mã hóa polypeptit này; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7, hoặc gen mã hóa polypeptit này; và hỗn hợp bất kỳ của chúng, sau đó bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào môi trường canh tác.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến chế phẩm tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo. Chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit

amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo. Chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; gen mã hóa polypeptit tương ứng này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; gen mã hóa polypeptit tương ứng này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit dùng để tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, polypeptit là một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến gen dùng để tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, gen này là một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.1; gen mã hóa polypeptit tương ứng này chứa trình tự axit amin

SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.3; gen mã hóa polypeptit tương ứng này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.5; gen mã hóa polypeptit tương ứng này chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến thể biến nạp có tính kháng chất diệt cỏ, thể biến nạp này được chuyển gen.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thực vật hoặc tảo có tính kháng chất diệt cỏ, bao gồm bước chuyển gen kháng chất diệt cỏ vào tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi hoặc thực vật.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, bao gồm bước chuyển gen kháng chất diệt cỏ vào tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi hoặc thực vật.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là hình ảnh thể hiện sự sinh trưởng của chủng *Halotheca* sp. PCC 7418 được nuôi cấy trong 8 ngày trên môi trường CRBIP (Institut Pasteur, France) không bổ sung tiafenacil hoặc có bổ sung 2 μ M hoặc 10 μ M tiafenacil.

Fig.2 là hình vẽ thể hiện cấu trúc của vector pACBB được sử dụng trong *E. coli* BT3(Δ PPO) theo sáng chế. eGFP được loại bỏ trước khi sử dụng, khi mỗi gen PPO được tách dòng vào vector.

Fig.3 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT) và gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) sau khi cấy chấm điểm chúng lên môi trường thạch chứa tiafenacil với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 25 μ M, và nuôi cấy chúng trong điều kiện ánh sáng và bóng tối.

Fig.4 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2 (được thể hiện bằng 2), gen CyPPO4 (được thể hiện bằng 4) và gen CyPPO8 (được thể hiện bằng 8) trên môi trường thạch chứa chất diệt cỏ pyrimidindion, tiafenacil, saflufenacil hoặc butafenacil, hoặc chất diệt cỏ N-phenylphthalimit, flumioxazin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 25 μ M. V thể hiện chủng được sản xuất bằng cách chuyển vector trống pACBB vào chủng BT3(Δ PPO).

Fig.5 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2 (được thể hiện bằng 2), gen CyPPO4 (được thể hiện bằng 4) và gen CyPPO8 (được thể hiện bằng 8) trên môi trường thạch chứa chất diệt cỏ diphenyl ete, tức là fomesafen, acifluorfen hoặc oxyfluorfen với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 400 μ M. V thể hiện chủng được sản xuất bằng cách chuyển vector trống pACBB vào chủng BT3(Δ PPO).

Fig.6 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2 (được thể hiện bằng 2), gen CyPPO4 (được thể hiện bằng 4) và gen CyPPO8 (được thể hiện bằng 8) trên môi trường thạch chứa chất diệt cỏ triazolinon, tức là sulfentrazone, chất diệt cỏ oxizolidindion, pentoxazon, chất diệt cỏ phenylpyrazol, pyraflufen-ethyl, chất diệt cỏ oxadiazol, oxadiazon, chất diệt cỏ thiadiazol, fluthiacet-metyl, hoặc chất diệt cỏ có cấu trúc khác, tức là pyraclonil với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 400 μ M. V thể hiện chủng được sản xuất bằng cách chuyển vector trống pACBB vào chủng BT3(Δ PPO).

Fig.7 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), và gen CyPPO12 trên môi trường thạch chứa tiafenacil, saflufenacil, flumioxazin, fomesafen hoặc oxyfluorfen với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 400 μ M.

Fig.8 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột

biến (được thể hiện bằng MT), và gen CyPPO12 trên môi trường thạch chứa pyraflufen-ethyl, oxadiazon, sulfentrazone, pentoxazon hoặc pyraclostrobin với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 400 μ M.

Fig.9 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2 và gen CyPPO4 trong môi trường LB lỏng chứa tiafenacil với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 100 μ M theo thời gian nuôi cấy.

Fig.10 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 trong môi trường LB lỏng chứa saflufenacil với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 100 μ M theo thời gian nuôi cấy.

Fig.11 là đồ thị thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 trong môi trường LB lỏng chứa fomesafen với nồng độ nằm trong khoảng từ 0 μ M đến 100 μ M theo thời gian nuôi cấy.

Fig.12 là hình ảnh thể hiện cấu trúc của vector biểu hiện thực vật được sử dụng để kiểm chứng biểu hiện gen PPO trong lục lạp của lá cây thuốc lá.

Fig.13 là hình ảnh thể hiện kết quả kiểm chứng biểu hiện gen YFP, gen AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT), gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 trong lục lạp của thực vật, mỗi gen này được tách dòng cấp hai vào vector được thể hiện trên Fig.12, sau đó chèn vào thực vật.

Fig.14 là hình ảnh thể hiện cấu trúc của vector chuyển gen thực vật, được sử dụng để chuyển gen PPO vào *Arabidopsis thaliana*.

Fig.15 là hình ảnh thể hiện kết quả kiểm chứng khả năng nảy mầm của hạt giống *Arabidopsis thaliana* thế hệ T₂ tương ứng được chuyển gen AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT), gen CyPPO2 và gen CyPPO8 trong môi trường MS 1/2 hoặc môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM. AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT)

dưới dạng mẫu đối chứng là hạt giống (T_2) được chuyển gen có tính kháng chất diệt cỏ ức chế PPO bằng cách thay thế axit amin.

Fig.16 là hình ảnh thể hiện kết quả thẩm tách Western của mỗi dòng *Arabidopsis thaliana* thế hệ T_2 được chuyển gen CyPPO2 để kiểm chứng biểu hiện của protein CyPPO2 được duy trì trong thế hệ tiếp theo hay không. CyPPO2(R) thể hiện dòng *Arabidopsis thaliana* chuyển gen kháng chất diệt cỏ, và CyPPO2(S) thể hiện dòng *Arabidopsis thaliana* chuyển gen nhạy với chất diệt cỏ. Hình ảnh bên dưới của Fig.16 thể hiện kết quả phân tích PCR để kiểm chứng việc chèn gen BAR vào vector nhị phân.

Fig.17 là hình ảnh thể hiện kết quả thẩm tách Western của mỗi dòng *Arabidopsis thaliana* thế hệ T_2 được chuyển gen CyPPO8 để kiểm chứng biểu hiện của protein CyPPO8 được duy trì trong thế hệ tiếp theo hay không. CyPPO8(R) thể hiện dòng *Arabidopsis thaliana* chuyển gen kháng chất diệt cỏ, và CyPPO8(S) thể hiện dòng *Arabidopsis thaliana* chuyển gen nhạy với chất diệt cỏ. Hình ảnh bên dưới của Fig.17 thể hiện kết quả phân tích PCR để kiểm chứng việc chèn gen BAR vào vector nhị phân.

Fig.18 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá sự sinh trưởng của *Arabidopsis thaliana* thế hệ T_2 tương ứng được chuyển gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 và gen đối chứng AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) sau 7 ngày phun với tiafenacil ở nồng độ 1 μ M. WT thể hiện kết quả của *Arabidopsis thaliana* thể dại.

Fig.19 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá sự sinh trưởng của *Arabidopsis thaliana* thế hệ T_2 tương ứng được chuyển gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 và gen đối chứng AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) sau 7 ngày phun với 0,5 μ M tiafenacil, 1 μ M saflufenacil, hoặc 3 μ M fomesafen. WT thể hiện kết quả của *Arabidopsis thaliana* thể dại.

Fig.20 là hình ảnh thể hiện kết quả gieo trồng hạt giống tương ứng của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen được chèn gen CyPPO2 và gen BAR và *Arabidopsis thaliana* chuyển gen được chèn gen CyPPO8 và gen BAR trên môi trường bổ sung glufosinat, môi trường bổ sung tiafenacil, hoặc môi trường bổ sung glufosinat và tiafenacil.

Fig.21 là hình ảnh thể hiện kết quả gieo trồng hạt giống của *Arabidopsis thaliana*

chuyển gen được chèn gen CyPPO2 hoặc gen CyPPO8 trong môi trường bổ sung tiafenacil, môi trường bổ sung saflufenacil, hoặc môi trường bổ sung tiafenacil và saflufenacil.

Fig.22 là hình ảnh thể hiện kết quả đánh giá mối tương quan giữa thể tương đồng axit amin của protein CyPPO2, protein CyPPO4, hoặc protein CyPPO8 và tính kháng chất diệt cỏ, và thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO2 (được thể hiện bằng 2M), gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO4 (được thể hiện bằng 4M) và gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO8 (được thể hiện bằng 8M) trên môi trường thạch chứa nồng độ khác nhau của tiafenacil, saflufenacil và butafenacil. AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT) và AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) được sử dụng làm nhóm đối chứng để đánh giá ức chế sinh trưởng.

Fig.23 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO2 (được thể hiện bằng 2M), gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO4 (được thể hiện bằng 4M) và gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO8 (được thể hiện bằng 8M) trên môi trường thạch chứa nồng độ khác nhau của acifluorfen, oxyfluorfen và fomesafen. AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT) và AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) được sử dụng làm nhóm đối chứng để đánh giá ức chế sinh trưởng.

Fig.24 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO2 (được thể hiện bằng 2M), gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO4 (được thể hiện bằng 4M) và gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO8 (được thể hiện bằng 8M) trên môi trường thạch chứa nồng độ khác nhau của sulfentrazone, oxadiazon, pentoxazon và pyraclostrobin. AtPPO1 thể dại (được thể hiện bằng WT) và AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) được sử dụng làm nhóm đối chứng để đánh giá ức chế sinh trưởng.

Fig.25 là hình ảnh thể hiện hoạt tính ức chế sinh trưởng của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO2 (được thể hiện bằng 2M), gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO4 (được thể hiện bằng 4M) và gen mã hóa biến thể trình tự axit amin CyPPO8 (được thể hiện bằng 8M) trên môi trường

thạch chứa nồng độ khác nhau của fluthiacet-metyl, pyraflufen-etyl và flumioxazin. AtPPO1 thể đại (được thể hiện bằng WT) và AtPPO1 đột biến (được thể hiện bằng MT) được sử dụng làm nhóm đối chứng để đánh giá ức chế sinh trưởng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Sáng chế đề cập đến peptit PPO có nguồn gốc từ chủng *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112, được gọi là CyPPO2, trình tự axit amin của nó như nêu trong SEQ ID NO.1, và trình tự nucleotit của gen mã hóa peptit tương ứng này như nêu trong SEQ ID NO.2.

Sáng chế cũng đề cập đến peptit PPO có nguồn gốc từ chủng *Lyngbya* sp. PCC 8106, được gọi là CyPPO4, trình tự axit amin của nó như nêu trong SEQ ID NO.3, và trình tự nucleotit của gen mã hóa peptit tương ứng này như nêu trong SEQ ID NO.4.

Sáng chế cũng đề cập đến peptit PPO có nguồn gốc từ chủng *Halotheca* sp. PCC 7418, được gọi là CyPPO8, trình tự axit amin của nó như nêu trong SEQ ID NO.5, và trình tự nucleotit của gen mã hóa peptit tương ứng này như nêu trong SEQ ID NO.6.

Sáng chế cũng đề cập đến peptit PPO có nguồn gốc từ chủng *Microcoleus vaginatus*, được gọi là CyPPO12, trình tự axit amin của nó như nêu trong SEQ ID NO.7, và trình tự nucleotit của gen mã hóa peptit tương ứng này như nêu trong SEQ ID NO.8. Trình tự axit amin của CyPPO12 có độ tương đồng bằng 94% so với trình tự axit amin của CyPPO2.

Protein PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế có thể bao gồm gốc thay đổi trong mạch protein mà không làm thay đổi hoạt tính của phân tử này. Gốc thay đổi này có thể bao gồm gốc thay thế, loại bỏ, bổ sung, và/hoặc chèn thêm axit amin. Ví dụ, các gốc thay đổi axit amin trong protein và peptit, mà không làm thay đổi hoạt tính của các phân tử này, đã biết trong lĩnh vực này. Các gốc thay đổi xuất hiện phổ biến nhất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, theo cả hai chiều. Khi cần, protein này có thể được cải biến bằng phương pháp phosphoryl hóa, sulfat hoá, acryl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, v.v. Ngoài ra, biến thể protein có thể bao gồm protein có độ ổn định cấu trúc được gia tăng để kháng

lại điều kiện nhiệt, độ pH, v.v. hoặc có hoạt tính được gia tăng bằng cách thay đổi hoặc cải biến trình tự axit amin.

Hơn nữa, protein PPO kháng chất diệt cỏ có thể là biến thể có hoạt tính sinh học tương đương với polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5, hoặc SEQ ID NO.7. Biến thể này có thể bao gồm gốc thay thế, loại bỏ, bổ sung, và/hoặc chèn thêm axit amin, so với thể đại hoặc protein chuẩn đối chiếu, và có hoạt tính sinh học tương đương với thể đại hoặc protein chuẩn đối chiếu. Thuật ngữ “độ tương đồng trình tự” được dùng trong bản mô tả để chỉ mức độ tương tự với thể đại hoặc trình tự axit amin đối chiếu hoặc trình tự nucleotit. Protein bất kỳ có thể nằm trong phạm vi của sáng chế, miễn là protein này chứa các gốc axit amin có độ tương đồng bằng 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của protein PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế, và cũng có hoạt tính sinh học tương đương với polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.7. Biến thể protein tương đương này có thể bao gồm trung tâm hoạt động tương đương với trung tâm hoạt động của protein mong muốn. Độ tương đồng có thể được so sánh bằng mắt hoặc với sự trợ giúp của các chương trình so sánh sẵn có. Các chương trình máy tính có bán trên thị trường này có thể tính toán tỷ lệ % tương đồng giữa hai hoặc nhiều trình tự, và tỷ lệ % tương đồng có thể được tính toán trên các trình tự tiếp giáp. Quá trình sắp thẳng hàng trình tự để so sánh có thể được thực hiện bằng cách phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA và TFASTA.

Hơn nữa, gen PPO kháng chất diệt cỏ được sử dụng trong sáng chế có thể bao gồm phân tử axit nucleic bao gồm các bộ ba mã hóa có chức năng tương đương với trình tự nucleotit của gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.5 hoặc SEQ ID NO.7, hoặc các bộ ba mã hóa các axit amin giống hệt nhau (bằng cách phân giải các bộ ba mã hóa), hoặc các bộ ba mã hóa các axit amin có hoạt tính sinh học tương đương. Hơn nữa, sáng chế cũng có thể bao gồm phân tử axit nucleic, mã hóa protein vẫn có hoạt tính sinh học tương đương với protein PPO kháng chất diệt cỏ, và cũng bao gồm các nucleotit có độ tương đồng ít nhất bằng 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao

hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn so với phân tử axit nucleic này khi trình tự nucleotit của gen mã hóa protein PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế và trình tự nucleotit bất kỳ khác được sắp thẳng hàng để bắt cặp chính xác tối đa, và các trình tự đã sắp thẳng hàng được phân tích bằng thuật toán thường được sử dụng trong lĩnh vực này.

Theo một phương án cụ thể, protein PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm bao gồm polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.1; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.3; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.5; polypeptit chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Hơn nữa, gen PPO kháng chất diệt cỏ bao gồm một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm bao gồm gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.1 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.1; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.3 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.3; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.5 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.5; gen mã hóa polypeptit tương ứng chứa trình tự axit amin SEQ ID NO.7 hoặc trình tự axit amin có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.7; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Gen này có thể là gen chứa, nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự nucleotit SEQ ID NO.2 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.2, gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.4 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.4, gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.6 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.6, gen chứa trình tự nucleotit SEQ ID NO.8 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc 98% hoặc cao hơn so với SEQ ID NO.8,

và/hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Protein PPO kháng chất diệt cỏ có thể được thu nhận từ nguồn tự nhiên bằng cách chiết xuất và tinh chế bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Theo cách khác, protein PPO kháng chất diệt cỏ có thể được thu nhận dưới dạng protein tổng hợp được điều chế bằng tổng hợp hóa học, hoặc dưới dạng protein tái tổ hợp được điều chế bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Khi được tổng hợp hóa học, protein này có thể được thu nhận bằng phương pháp tổng hợp polypeptit đã biết trong lĩnh vực này. Khi kỹ thuật tái tổ hợp gen được sử dụng, axit nucleic mã hóa protein PPO kháng chất diệt cỏ được chèn vào vector biểu hiện thích hợp, vector này được biến nạp vào tế bào vật chủ, tế bào vật chủ này được nuôi cấy để biểu hiện protein mong muốn, sau đó protein PPO kháng chất diệt cỏ được thu nhận từ tế bào vật chủ này. Sau khi protein này được biểu hiện ở tế bào vật chủ được chọn, các kỹ thuật phân tách sinh hóa thông thường, ví dụ, xử lý với chất kết tủa protein (kết tủa bằng muối), ly tâm, phá vỡ bằng siêu âm, siêu lọc, lọc pha loãng bằng dung môi, sắc ký, như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp thụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực và tương tự có thể được sử dụng để phân lập và tinh chế nó. Nhìn chung, để phân tách protein này với độ tinh khiết cao, các phương pháp này có thể được sử dụng kết hợp.

Phân tử axit nucleic PPO kháng chất diệt cỏ có thể được phân lập hoặc điều chế bằng các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, ví dụ, phương pháp tổng hợp hóa học hoặc phương pháp tái tổ hợp. Theo cách khác, phương pháp có bán trên thị trường có thể được sử dụng.

Theo phương án cụ thể, các protein PPO này được phát hiện là có tính kháng chất diệt cỏ phổ rộng kháng lại 9 loại chất diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO được phân loại theo cấu trúc hóa học của chúng trong hệ thử nghiệm tính kháng chất diệt cỏ sử dụng *E. coli* BT3(Δ PPO) không chứa gen PPO. Cũng phát hiện thấy rằng các protein này có thể được biểu hiện trong lá cây thuốc lá bằng phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, và các protein này cũng có thể được biểu hiện trong lục lạp của thực vật bằng cách sử dụng peptit vận chuyển (TP). Hơn nữa, đã phát hiện thấy rằng các protein PPO này cũng có thể được biểu hiện trong *Arabidopsis thaliana* (giống Columbia) bằng vector biểu hiện thực vật. Mặc dù, các thực vật chuyển gen này được xử lý bằng các chất diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO, nhưng khả năng nảy mầm và sinh trưởng của các thực vật này được quan sát. Hơn nữa, khả năng di truyền của các tính trạng kháng chất diệt cỏ nêu trên cho thế hệ tiếp

theo được kiểm chứng bằng nghiên cứu khả năng di truyền.

Do đó, protein PPO theo sáng chế có thể được chèn vào thực vật hoặc tảo, để tăng cường tính kháng chất diệt cỏ của thực vật hoặc tảo.

Thuật ngữ “chất diệt cỏ” được dùng trong bản mô tả để chỉ hoạt chất tiêu diệt, kiểm soát hoặc biến đổi khả năng sinh trưởng của thực vật hoặc tảo. Thuật ngữ “khả năng chống chịu chất diệt cỏ” hoặc “tính kháng chất diệt cỏ” có nghĩa là ngay cả sau khi xử lý với chất diệt cỏ thường tiêu diệt thực vật hoặc tảo thông thường hoặc thể đại hoặc thường ức chế khả năng sinh trưởng của chúng, thì hoạt tính ức chế sinh trưởng của thực vật hoặc tảo bị suy yếu hoặc loại bỏ, so với thực vật hoặc tảo thông thường hoặc thể đại, do đó thực vật hoặc tảo tiếp tục sinh trưởng. Chất diệt cỏ bao gồm chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO) của thực vật. Chất diệt cỏ ức chế PPO có thể được phân loại thành pyrimidinđion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphtalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinđion, và các chất diệt cỏ có cấu trúc khác theo cấu trúc hóa học của chúng.

Theo một phương án cụ thể, chất diệt cỏ pyrimidinđion bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở butafenacil, saflufenacil, benzfendizon, và tiafenacil.

Chất diệt cỏ diphenyl-ete bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, acifluorfen, bifenox, ethoxyfen, lactofen, chlomethoxyfen, chlorintofen, floglycofen-etyl, và halosafen.

Chất diệt cỏ phenylpyrazol bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở pyraflufen-etyl và fluazolat.

Chất diệt cỏ phenylphtalimit bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở flumioxazin, cinidon-etyl, và flumiclorac-pentyl.

Chất diệt cỏ thiadiazol bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở fluthiacet và thidiazimin.

Chất diệt cỏ oxadiazol bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở oxadiargyl và oxadiazon.

Chất diệt cỏ triazolinon bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở carfentrazone,

sulfentrazon, và azafenidin.

Chất diệt cỏ oxazolidindion bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở pentoxazon.

Các chất diệt cỏ có cấu trúc khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở pyraclonil, flufenpyr-ethyl và profluazol.

Gen PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế có thể được chèn vào thực vật hoặc tảo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, tốt hơn nếu bằng cách sử dụng vector biểu hiện để chuyển gen thực vật hoặc tảo.

Vùng khởi đầu thích hợp chứa trong vector có thể là vùng khởi đầu bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực này để chèn gen vào thực vật hoặc tảo. Ví dụ, vùng khởi đầu để chuyển gen thực vật có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở vùng khởi đầu SP6, vùng khởi đầu T7, vùng khởi đầu T3, vùng khởi đầu PM, vùng khởi đầu ubiquitin của ngô, vùng khởi đầu 35S của virus gây bệnh khảm trên súp lơ, vùng khởi đầu nopalinsynthaza (nos), vùng khởi đầu 35S của virus gây bệnh khảm trên cây huyền sâm, vùng khởi đầu của virus bacilliform gây bệnh trên mía, vùng khởi đầu của virus gây bệnh đốm vàng trên thực vật thuộc chi thài lải, vùng khởi đầu cảm ứng ánh sáng từ tiểu đơn vị mạch ngắn của ribulose-1,5-bisphosphat carboxylaza (ssRUBISCO), vùng khởi đầu triozaphosphat isomeraza (TPI) bảo tương của lúa, vùng khởi đầu adenine phosphoribosyltransferaza (APRT) của *Arabidopsis*, vùng khởi đầu octopine synthaza, và vùng khởi đầu BCB (protein gắn kết đồng sulfat).

Hơn nữa, vector chuyển gen thực vật có thể bao gồm trình tự tín hiệu polyA gây polyadenyl hóa ở đầu tận cùng 3', ví dụ vector chuyển gen thực vật có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở đầu 3' NOS có nguồn gốc từ gen nopalinsynthaza của *Agrobacterium tumefaciens*, vùng kết thúc octopine synthaza có nguồn gốc từ gen octopine synthaza của *Agrobacterium tumefaciens*, đầu 3' của gen ức chế proteaza I hoặc II của cà chua hoặc khoai tây, vùng kết thúc 35S CaMV, vùng kết thúc α -amylaza của lúa RAmy1A, và vùng kết thúc phaseolin.

Hơn nữa, vùng khởi đầu để chuyển gen tảo có thể là vùng khởi đầu đặc hiệu lục lạp, vùng khởi đầu nhân, vùng khởi đầu cấu trúc hoặc vùng khởi đầu cảm ứng. Gen mã hóa gen PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế có thể có thể được liên kết điều khiển với

5' UTR hoặc 3' UTR có chức năng trong nhân của tảo. Hơn nữa, vector để chuyển gen tảo có thể bao gồm trình tự điều hòa phiên mã để biểu hiện gen trong nhân của tảo. Gen tái tổ hợp tạo tính kháng chất diệt cỏ có thể được tích hợp vào bộ gen nhân hoặc bộ gen lục lạp của vật chủ tảo, gen tái tổ hợp tạo tính kháng chất diệt cỏ có thể được tích hợp vào bộ gen nhân hoặc bộ gen lục lạp của vật tảo chủ nhân thật.

Trong vector, peptit vận chuyển cần để hướng đích vào lục lạp có thể được liên kết với đầu 5' của gen PPO để biểu hiện gen PPO kháng chất diệt cỏ trong lục lạp.

Tùy ý, vector có thể còn bao gồm gen mã hóa chất chỉ thị chọn lọc dưới dạng phân tử chỉ thị, và ví dụ về gen chỉ thị chọn lọc có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở gen kháng kháng sinh (ví dụ neomycin, carbenicillin, kanamycin, spectinomycin, hygromycin, bleomycin, cloramphenicol, v.v.) hoặc gen kháng chất diệt cỏ (glyphosat, glufosinat, phosphinothricin, v.v.).

Hơn nữa, vector tái tổ hợp để biểu hiện thực vật có thể bao gồm vector nhị phân *Agrobacterium*, vector tích hợp đồng thời, hoặc vector thông thường không có vùng T-ADN nhưng được thiết kế để biểu hiện trong thực vật. Trong số chúng, vector nhị phân được dùng trong bản mô tả để chỉ vector chứa hai hệ vector tách biệt mang một plasmit để di chuyển chứa đoạn ranh giới bên trái (LB) và đoạn ranh giới bên phải (RB) trong plasmit cảm ứng khối u Ti, và các plasmit khác để chuyển gen đích, và vector có thể bao gồm vùng khởi đầu và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa để biểu hiện ở thực vật.

Khi vector nhị phân hoặc vector tích hợp đồng thời được sử dụng, tốt hơn nếu chúng để chuyển gen vector tái tổ hợp vào thực vật là *Agrobacterium* (phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium*). Về vấn đề này, *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *Agrobacterium rhizogen* có thể được sử dụng. Ngoài ra, khi vector không có vùng T-ADN được sử dụng, thì phương pháp xung điện, phương pháp bắn phá vi hạt, phương pháp hấp thụ nhờ polyetylen glycol, v.v. có thể được sử dụng để chèn plasmit tái tổ hợp vào thực vật.

Thực vật được chuyển gen bằng phương pháp nêu trên có thể được tái biệt hóa thành thực vật nhờ cảm ứng mô sẹo, tạo rễ, và trồng vào đất sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Thực vật được chuyển gen theo sáng chế bao gồm tế bào thực vật (chứa hỗn dịch nuôi cấy tế bào), tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi cũng như thực vật trưởng thành.

Hơn nữa, thể biến nạp này bao gồm thể biến nạp được chèn với gen cũng như sản phẩm tách dòng hoặc thể biến nạp thế hệ sau của nó (thế hệ T₁, thế hệ T₂, hoặc thế hệ bất kỳ tiếp theo). Ví dụ, thực vật chuyển gen cũng bao gồm thực vật có tính kháng chất diệt cỏ được di truyền dưới dạng thực vật thế hệ sau có khả năng sinh sản và không có khả năng sinh sản của thực vật được chuyển gen theo sáng chế. Sáng chế cũng bao gồm toàn bộ các thể đột biến và biến thể có đặc tính của thực vật chuyển gen ban đầu, cùng với toàn bộ các sản phẩm lai hóa và dung hợp của thực vật được chuyển gen theo sáng chế. Hơn nữa, sáng chế cũng bao gồm bộ phận của thực vật, như hạt giống, hoa, thân, quả, lá, rễ, thân củ, rễ củ, có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen được chuyển gen trước bằng phương pháp theo sáng chế, hoặc thực vật thế hệ sau của nó, và bao gồm ít nhất một bộ phận của tế bào chuyển gen.

Không có giới hạn cụ thể về thực vật được sử dụng theo sáng chế, bao gồm thực vật một lá mầm hoặc thực vật hai lá mầm. Hơn nữa, thực vật bao gồm thực vật thân thảo hoặc thực vật thân gỗ. Thực vật một lá mầm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở thực vật thuộc họ *Alismataceae*, *Hydrocharitaceae*, *Juncaginaceae*, *Scheuchzeriaceae*, *Potamogetonaceae*, *Najadaceae*, *Zosteraceae*, *Liliaceae*, *Haemodoraceae*, *Agavaceae*, *Amaryllidaceae*, *Dioscoreaceae*, *Pontederiaceae*, *Iridaceae*, *Burmanniaceae*, *Juncaceae*, *Commelinaceae*, *Eriocaulaceae*, *Gramineae*, *Poaceae*, *Araceae*, *Lemnaceae*, *Sparganiaceae*, *Typhaceae*, *Cyperaceae*, *Musaceae*, *Zingiberaceae*, *Cannaceae*, *Orchidaceae*.

Thực vật hai lá mầm có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở thực vật thuộc họ *Diapensiaceae*, *Clethraceae*, *Pyrolaceae*, *Ericaceae*, *Myrsinaceae*, *Primulaceae*, *Plumbaginaceae*, *Ebenaceae*, *Styracaceae*, *Symplocaceae*, *Symplocaceae*, *Oleaceae*, *Loganiaceae*, *Gentianaceae*, *Menyanthaceae*, *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Rubiaceae*, *Polemoniaceae*, *Convolvulaceae*, *Boraginaceae*, *Verbenaceae*, *Labiatae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Bignoniaceae*, *Acanthaceae*, *Pedaliaceae*, *Orobanchaceae*, *Gesneriaceae*, *Lentibulariaceae*, *Phrymaceae*, *Plantaginaceae*, *Caprifoliaceae*, *Adoxaceae*, *Valerianaceae*, *Dipsacaceae*, *Campanulaceae*, *Compositae*, *Myricaceae*,

Juglandaceae, Salicaceae, Betulaceae, Fagaceae, Ulmaceae, Moraceae, Urticaceae, Santalaceae, Loranthaceae, Polygonaceae, Phytolaccaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae, Portulacaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Cactaceae, Magnoliaceae, Illiciaceae, Lauraceae, Cercidiphyllaceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Lardizabalaceae, Menispermaceae, Nymphaeaceae, Ceratophyllaceae, Cabombaceae, Saururaceae, Piperaceae, Chloranthaceae, Aristolochiaceae, Actinidiaceae, Theaceae, Guttiferae, Droseraceae, Papaveraceae, Capparidaceae, Cruciferae, Platanaceae, Hamamelidaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae, Eucommiaceae, Pittosporaceae, Rosaceae, Leguminosae, Oxalidaceae, Geraniaceae, Tropaeolaceae, Zygophyllaceae, Linaceae, Euphorbiaceae, Callitrichaceae, Rutaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Polygalaceae, Anacardiaceae, Aceraceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sabiaceae, Balsaminaceae, Aquifoliaceae, Celastraceae, Staphyleaceae, Buxaceae, Empetraceae, Rhamnaceae, Vitaceae, Elaeocarpaceae, Tiliaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Thymelaeaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Violaceae, Passifloraceae, Tamaricaceae, Elatinaceae, Begoniaceae, Cucurbitaceae, Lythraceae, Punicaceae, Onagraceae, Haloragaceae, Alangiaceae, Cornaceae, Araliaceae, Umbelliferae (Apiaceae).

Theo một phương án cụ thể, thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở cây trồng lương thực, như lúa, lúa mỳ, lúa mạch, ngô, đậu tương, khoai tây, lúa mỳ, đậu đỏ, yến mạch, và lúa miến; rau xanh, như *Arabidopsis thaliana*, cải bắp Trung Quốc, cải cay, ớt, dâu tây, cà chua, dưa hấu, dưa chuột, cải bắp, dưa lê, bí ngô, hành tây, hành ta, và cà rốt; cây trồng để sử dụng đặc biệt, như nhân sâm, thuốc lá, bông, cỏ tươi, cây lương thảo, vùng, mía đường, củ cải đường, *Perilla* sp., lạc, cải dầu, cỏ, và thầu dầu; cây ăn quả, như táo, lê, táo ta, đào, kiwi, nho, cây họ cam, hồng vàng, mận, mơ và chuối; thực vật thân gỗ, như thông, dầu cọ, và cây bạch đàn; cây lấy hoa, như hoa hồng, hoa lay-ơn, hoa đồng tiền, hoa cẩm chướng, hoa cúc, hoa ly và hoa tulip; và cây trồng dùng làm thức ăn gia súc, như cỏ mạch đen, cỏ ba lá đỏ, cỏ nón, cỏ linh lăng, cỏ roi và cỏ mạch đen lâu năm. Ví dụ cụ thể về thực vật có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở thực vật hai lá mầm, như *Arabidopsis thaliana*, khoai tây, cà tím, thuốc lá, ớt, cà chua, ngưu bàng, cúc tần ô, rau diếp, cát cánh, rau bina, cải cầu vồng, khoai lang, cần tây, cà rốt, cần ta, mùi tây, cải bắp Trung Quốc, cải bắp, cải cay, dưa hấu, dưa lê, dưa chuột, bí ngô, bầu, dâu tây, đậu tương, đậu xanh, đậu lửa, và đậu Hà Lan.

Không có giới hạn cụ thể về tảo được sử dụng trong sáng chế, bao gồm tảo nhân sơ hoặc tảo nhân thật. Theo một số phương án, tảo có thể là vi khuẩn lam, tảo lục, tảo đỏ, tảo lớn hoặc vi tảo.

Vi khuẩn lam có thể là vi khuẩn thuộc ngành *Chroococcales* (bao gồm *Aphanocapsa*, *Aphanotece*, *Chamaesiphon*, *Chondrocystis*, *Chroococcus*, *Chroogloeocystis*, *Crocospaera*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Cyanodictyon*, *Cyanosarcina*, *Cyanothece*, *Dactylococcopsis*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Halothece*, *Johannesbaptistia*, *Merismopedia*, *Microcystis*, *Radiocystis*, *Rhabdoderma*, *Snowella*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Woronichinia*), *Gloeobacteria*, *Nostocales* (bao gồm *Microchaetaceae*, *Nostocaceae*, *Rivulariaceae*, *Scytonemataceae*), *Oscillatoriales* (bao gồm *Arthronema*, *Arthrospira*, *Blennothrix*, *Crinalium*, *Geitlerinema*, *Halomicronema*, *Halospirulina*, *Hydrocoleum*, *Jaaginema*, *Katagnymene*, *Komvophoron*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothricoides*, *Planktothrix*, *Plectonema*, *Pseudanabaena*, *Pseudophormidium*, *Schizothrix*, *Spirulina*, *Starria*, *Symploca*, *Trichodesmium*, *Tychonema*), *Pleurocapsales* (bao gồm *Chroococcidiopsis*, *Dermocarpa*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Pleurocapsa*, *Solentia*, *Stanieria*, *Xenococcus*), *Prochlorales*, hoặc *Stigonematales* (bao gồm *Capsosira*, *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Hapalosiphon*, *Mastigocladopsis*, *Mastigocladus*, *Nostochopsis*, *Stigonema*, *Symphyonema*, *Symphonemopsis*, *Umezakia*, *Westiellopsis*).

Tảo có thể còn bao gồm các loài thuộc ngành *Chlorophyta*, *Chlamydomonas*, *Volvacales*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, hoặc *Hematococcm*.

Tảo có thể còn bao gồm *Phaeodactylum tricornutum*, *Amphiprora hyaline*, *Amphora* spp., *Chaetoceros muelleri*, *Navicula saprophila*, *Nitzschia communis*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis suecica*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Neochloris oleoabundans*, *Synechococcus elongatus*, *Botryococcus braunii*, *Gloeobacter violaceus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Botryococcus sudeticus*, *Euglena gracilis*, *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia palea*, *Pleurochrysis carterae*, *Tetraselmis chuii*, *Pavlova* spp., *Aphanocapsa* spp., *Synechosystis* spp., *Nannochloris* spp. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng danh sách này không chỉ giới hạn

ở các loài nêu trên, và các loài và chi khác cũng có thể được sử dụng.

Thực vật hoặc tảo được chèn với pPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế có thể có tính kháng hai hoặc nhiều chất diệt cỏ ức chế PPO.

Do đó, theo một phương án cụ thể, hai hoặc nhiều chất diệt cỏ ức chế PPO có thể được sử dụng luân phiên hoặc đồng thời để kiểm soát cỏ dại và/hoặc loài thủy sinh không mong muốn.

Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ dại ở vùng đất trồng trọt, bao gồm bước trồng thực vật chứa protein PPO kháng chất diệt cỏ hoặc gen mã hóa peptit tương ứng trên vùng đất trồng trọt, sau đó bón hai hoặc nhiều chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào vùng đất trồng trọt ở lượng hữu hiệu luân phiên hoặc đồng thời.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát loài thủy sinh không mong muốn trong môi trường canh tác, bao gồm bước nuôi trồng tảo chứa protein PPO kháng chất diệt cỏ hoặc gen mã hóa peptit tương ứng trên môi trường canh tác, sau đó bón hai hoặc nhiều chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào môi trường canh tác ở lượng hữu hiệu luân phiên hoặc đồng thời.

Hơn nữa, protein PPO kháng chất diệt cỏ hoặc gen theo sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng.

Do đó, thực vật hoặc tảo được chèn với pPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế có thể có tính kháng hai hoặc nhiều chất diệt cỏ có cơ chế tác dụng khác nhau. Theo sáng chế, hai hoặc nhiều chất diệt cỏ có cơ chế tác dụng khác nhau bao gồm chất diệt cỏ ức chế PPO, có cơ chế tác dụng khác nhau, có thể được sử dụng luân phiên hoặc đồng thời, nhờ đó kiểm soát được cỏ dại và/hoặc loài thủy sinh không mong muốn. Sau đây, chất diệt cỏ có cơ chế tác dụng khác với chất diệt cỏ ức chế PPO được gọi là “chất diệt cỏ thứ hai”.

Sáng chế đề cập đến chế phẩm peptit hoặc chế phẩm nucleotit tạo và/hoặc tăng cường tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, chế phẩm này bao gồm protein PPO kháng chất diệt cỏ nêu trên hoặc gen mã hóa peptit tương ứng; và polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng.

Sáng chế cũng đề cập đến thể biến nạp, hoặc sản phẩm tách dòng hoặc thể biến nạp thể hệ sau của nó có tính kháng chất diệt cỏ mới và/hoặc tăng cường, thể biến nạp này, hoặc sản phẩm tách dòng hoặc thể biến nạp thể hệ sau của nó bao gồm protein PPO kháng chất diệt cỏ nêu trên hoặc gen mã hóa peptit tương ứng; và polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sản xuất thực vật hoặc tảo có tính kháng chất diệt cỏ mới và/hoặc tăng cường, bao gồm bước chuyển gen tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi hoặc thực vật với protein PPO kháng chất diệt cỏ nêu trên hoặc gen mã hóa peptit tương ứng; và polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ dại ở vùng đất trồng trọt, bao gồm bước trồng thực vật chứa protein PPO kháng chất diệt cỏ nêu trên hoặc gen mã hóa peptit tương ứng; và polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng trên vùng đất trồng trọt, và bón chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và chất diệt cỏ thứ hai vào vùng đất trồng trọt ở lượng hữu hiệu của chúng, luân phiên hoặc đồng thời.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát loài thủy sinh không mong muốn trong môi trường canh tác, bao gồm bước nuôi trồng tảo chứa protein PPO kháng chất diệt cỏ nêu trên hoặc gen mã hóa peptit tương ứng; và polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng trên môi trường canh tác, và bón chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và chất diệt cỏ thứ hai vào môi trường canh tác ở lượng hữu hiệu của chúng, luân phiên hoặc đồng thời.

Theo một phương án cụ thể, thực vật hoặc tảo theo sáng chế có thể còn chứa polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa peptit tương ứng, nhờ đó có tính kháng chất diệt cỏ thứ hai mới và/hoặc tăng cường.

Theo một phương án cụ thể khác, chất diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm chất diệt cỏ ức chế phân chia tế bào, chất diệt cỏ ức chế quang hợp, chất diệt cỏ ức chế tổng hợp axit amin, chất diệt cỏ ức chế lập thể, chất diệt cỏ ức chế màng tế bào, và/hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở. Chất diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm glyphosat, glufosinat, dicamba, axit 2,4-diclophenoxyaxetic, chất diệt cỏ ức chế axetolactat synthaza

(ví dụ imidazolidinon, sulfonylurea, triazol pyrimidin, sulphonanilit, pyrimidin thiobenzoat, v.v.), chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II, chất diệt cỏ phenylure, chất diệt cỏ ức chế lập thể, chất diệt cỏ bromoxynil, và/hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng, nhưng không chỉ giới hạn ở.

Theo một phương án cụ thể khác, polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza, glyphosat oxidaza, glyphosat-N-axetyltransferaza hoặc glyphosat decarboxylaza kháng chất diệt cỏ glyphosat; phosphinothricin-N-axetyltransferaza kháng chất diệt cỏ glufosinat; monooxygenaza kháng chất diệt cỏ dicamba; axit 2,4-diclophenoxyaxetic monooxygenaza hoặc aryloxyalkanoat dioxygenaza kháng chất diệt cỏ axit 2,4-diclophenoxyaxetic; axetolactat synthaza, axit axetohydroxy synthaza, hoặc axit axetohydroxy synthaza tiểu đơn vị mạch dài kháng chất diệt cỏ sulfonylurea chất diệt cỏ ức chế axetolactat synthaza; protein D1 hệ quang hóa II kháng chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; cytochrom P450 kháng chất diệt cỏ phenylure; hydroxylphenylpyruvat dioxygenaza kháng chất diệt cỏ ức chế lập thể; nitrilaza kháng chất diệt cỏ bromoxynil; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Hơn nữa, gen mã hóa polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở gen CP4 EPSPS, EPSPS(AG), MEPSPS, 2MEPSPS, GOXV247, GAT4601 hoặc GAT4621 kháng chất diệt cỏ glyphosat; gen BAR, PAT hoặc PAT(SYN) kháng chất diệt cỏ glufosinat; gen DMO kháng chất diệt cỏ dicamba; gen AAD-1 hoặc AAD-12 kháng chất diệt cỏ axit 2,4-diclophenoxyaxetic; gen ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, CSR1, CSR1-1, CSR1-2, SURA hoặc SURB kháng chất diệt cỏ sulfonylurea chất diệt cỏ ức chế axetolactat synthaza; gen PSBA kháng chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; gen CYP76B1 kháng chất diệt cỏ phenylurea; gen HPPDPF W336 kháng chất diệt cỏ isoxaflutol; gen BXN kháng chất diệt cỏ bromoxynil; và hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Sáng chế có thể bao gồm nhiều phương án khác nhau, và không chỉ giới hạn ở các phương án này. Hơn nữa, các phương án này được đề cập đến để thực hiện sáng chế này, và sẽ hoàn toàn nằm trong phạm vi của sáng chế. Các chữ số tham chiếu tương tự là để chỉ các yếu tố tương tự.

Cần hiểu rằng, mặc dù thuật ngữ “thứ nhất”, “thứ hai”, “thứ ba” v.v. có thể được sử dụng trong sáng chế để mô tả các yếu tố hoặc thành phần khác nhau, nhưng các yếu tố hoặc thành phần này không chỉ giới hạn ở các thuật ngữ này. Các thuật ngữ này được sử dụng chỉ để phân biệt một yếu tố hoặc thành phần với một yếu tố hoặc thành phần khác.

Thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế chỉ nhằm mục đích mô tả các phương án cụ thể, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương án này. Các mạo từ số ít “a,” “an” và “the” cũng bao gồm số nhiều, trừ khi có quy định khác. Cần hiểu rằng thuật ngữ “chứa” và/hoặc “có chứa”, hoặc “bao gồm” và/hoặc “có bao gồm” được dùng trong bản mô tả để cụ thể hóa sự có mặt của các dấu hiệu, yếu tố, và/hoặc thành phần cụ thể, nhưng không bao gồm sự có mặt hoặc bổ sung của một hoặc nhiều các dấu hiệu, yếu tố hoặc thành phần khác, và/hoặc các nhóm của chúng. Thuật ngữ “và/hoặc” bao gồm toàn bộ các tổ hợp của một hoặc nhiều thành phần liên quan.

Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết bởi một số phương án, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án này. Hơn nữa, sáng chế có thể được cải biến để kết hợp một số biến đổi, thay đổi, thay thế, hoặc bố trí tương đương không được mô tả trong bản mô tả này, nhưng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

PPO kháng chất diệt cỏ theo sáng chế được chèn vào thực vật hoặc tảo, bao gồm cây trồng có giá trị, sau đó quá trình kiểm soát chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng tính kháng chất diệt cỏ và chất diệt cỏ, nhờ đó kiểm soát cỏ dại một cách có kinh tế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế chứ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1. Phân lập gen PPO từ sinh vật nhân sơ

Chủng *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112, chủng *Lyngbya* sp. PCC 8106, và chủng *Halotheca* sp. PCC 7418 do Institut Pasteur, (France) cung cấp, và gen PPO được phân lập từ mỗi chủng này bằng phương pháp PCR sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 1. ADN bộ gen được phân lập từ mỗi chủng này, và gen PPO được phân lập và khuếch đại sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 1. Trình tự của gen PPO có nguồn gốc từ *Microcoleus vaginatus* (GenScript) được tổng hợp bằng cách tối ưu hóa tần

suất sử dụng bộ ba mã hóa của *Arabidopsis thaliana* sử dụng thông tin cơ sở dữ liệu Ngân hàng Gen và khuếch đại bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thể hiện trong Bảng 1. Hỗn hợp phản ứng PCR (50 μ L) được điều chế bằng cách trộn 1 μ L mỗi khuôn (ADN bộ gen của mỗi chủng), 5 μ L dung dịch đệm 10X, 2 μ L hỗn hợp dNTP (mỗi 10mM), 3 μ L đoạn mồi xuôi (10 μ M), 3 μ L đoạn mồi ngược (10 μ M), 35,5 μ L DDW, và 0,5 μ L Pfu-X (Solgent, 2,5 đơn vị/ μ L) hoặc EF-taq (Solgent, 2,5 đơn vị/ μ L), và phản ứng khuếch đại được thực hiện trong các điều kiện ở nhiệt độ 94°C trong 4 phút, và 30 chu trình (ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ở nhiệt độ 56°C trong 30 giây và ở nhiệt độ 72°C trong 1,5 phút), ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút và ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút. PPO được phân lập từ chủng *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112 được ký hiệu là CyPPO2, PPO được phân lập từ chủng *Lyngbya* sp. PCC 8106 được ký hiệu là CyPPO4, PPO được phân lập từ chủng *Halotheca* sp. PCC 7418 được ký hiệu là CyPPO8, và PPO được phân lập từ chủng *Microcoleus vaginatus* được ký hiệu là CyPPO12.

Hơn nữa, trình tự axit amin và trình tự nucleotit tương ứng của CyPPO2, CyPPO4, CyPPO8 và CyPPO12 được xác định và thể hiện bởi SEQ ID NO.1 đến 8, và đặc biệt là, trình tự axit amin của CyPPO2 có độ tương đồng bằng 94% so với trình tự axit amin của CyPPO12.

Bảng 1

Chủng	Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO.
<i>Oscillatoria nigroviridis</i> PCC 7112	PCC7112_BmHIF	ccccggatccATGGAAC TATTAGATACCTTG ATTGTGGG	18
	PCC7112_StuIR	cccaggcctGATCGATCGAGTATCTGATTG	19
<i>Halotheca</i> sp. PCC 7418	PCC7418_BmHIF	ccccggatccATGATAGATACTTTAATTGTG GG	20
	PCC7418_XhoIR	ccccctcgagACCCAAATAATCTAACACGG	21
<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	PCC8106_BglIIF	ccccgatctATGACTCACGTACTCGATAG	22
	PCC8106_XhoIR	ccccctcgagTTGACCCAAAAAACTGAGAAT TTC	23
<i>Microcoleus vaginatus</i>	CyPPO12_BamHIF	CCCCGGATCCATGGAAC TCTTG GATACT CT	24
	CyPPO12_XhoIR	CCCCCTCGAGGATTGACCTGGTATCAGA TT	25

Ví dụ 2. Đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của chủng *Halotheca* sp. PCC 7418

Chủng *Halotheca* sp. PCC 7418 được nuôi cấy trên môi trường CRBIP 1538 (Institut Pasteur, France). Môi trường CRBIP 1538 là môi trường hỗn hợp chứa môi

trường ASNIII và muối Turks Island 4X ở tỷ lệ bằng 1:1 (thể tích/thể tích), và môi trường ASNIII chứa 25,0g NaCl, 3,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5g KCl, 0,5g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,75g NaNO_3 , 0,02g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,04g NaCO_3 , 2,5mL dung dịch amoni sắt (III) xitrat/axit xitric monohydrat [hỗn hợp chứa 300mg amoni sắt (III) xitrat, 300mg axit xitric monohydrat, và 250mL nước cất], 2,5mL dung dịch magie titriplex dihydrat [hỗn hợp chứa 0,1g Mg EDTA và 500mL nước cất], 1mL kim loại vi lượng A5 + Co [hỗn hợp chứa 2,86g H_3BO_3 , 1,81g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,222g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,39g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,079g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,049g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ và 1000mL nước cất], và 1000mL nước cất. Muối Turks Island 4X chứa 112g NaCl, 2,68g KCl, 22g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 27,7g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,8g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, và 1000mL nước cất. Môi trường ASNIII và muối Turks Island 4X được tương ứng khử trùng bằng nồi hấp ở nhiệt độ 120°C trong 20 phút, sau đó trộn ở tỷ lệ bằng 1:1 (thể tích/thể tích).

Môi trường nuôi cấy nêu trên (5mL) được bổ sung vào ống thử nghiệm, và tiafenacil ($2\mu\text{M}$ hoặc $10\mu\text{M}$) được bổ sung vào hoặc không. Chủng *Halothece* sp. PCC 7418 đã nuôi cấy khuẩn lạc được bổ sung vào mỗi ống thử nghiệm ở thể tích tương đương và sự sinh trưởng của chủng này được đánh giá trong 8 ngày. Kết quả là, sự sinh trưởng của chủng *Halothece* sp. PCC 7418 được duy trì ngay cả ở 8 ngày sau khi xử lý với $10\mu\text{M}$ tiafenacil, cho thấy rằng chủng này có tính kháng chất diệt cỏ (Fig.1).

Ví dụ 3. Đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của CyPPO2, CyPPO4, CyPPO8 và CyPPO12 trong *E.coli* không chứa gen PPO (môi trường thạch)

Để đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của CyPPO2, CyPPO4, CyPPO8 và CyPPO12 được phân lập trong ví dụ 1, chủng *E. coli* BT3 không chứa gen PPO [sau đây gọi tắt là BT3(Δ PPO)] được biến nạp tương ứng với gen CyPPO2, gen CyPPO4, gen CyPPO8 hoặc gen CyPPO12, sau đó nuôi cấy trong sự có mặt của chất diệt cỏ để đánh giá ức chế sinh trưởng *E. coli* đã chuyển gen. PPO thể đại có nguồn gốc từ *Arabidopsis thaliana* (AtPPO1 thể đại) được sử dụng làm mẫu đối chứng âm, và AtPPO1 thể đại có tính nhạy với chất diệt cỏ ức chế PPO và thông tin trình tự của nó có mã truy cập Ngân hàng Gen số AX084732 (trình tự nucleotit của gen này như nêu trong SEQ ID NO.10, và trình tự axit amin của nó như nêu trong SEQ ID NO.9). AtPPO1 đột biến được sử dụng làm mẫu đối chứng dương, trong đó đột biến thay thế axit amin Y426M (thay thế tyrosin bằng metionin ở vị trí số 426) và S305L (thay thế serin bằng leucin ở vị trí số 305) xuất hiện

trong trình tự axit amin của AtPPO1 thể dại (trình tự axit amin như nêu trong SEQ ID NO.11) (Li X, Volrath SL., N D B.G., Chilcott CE, Johnson MA, Ward ER, Law MD (2003) *Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize. Plant physiology* 133:736-747). Chủng BT3(Δ PPO) do Hokkaido University (Japan) cung cấp là chủng E. coli không chứa gen PPO loại hemG và có tính kháng kanamycin (Watanabe et al., (2001) *Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame inhibition codons*. JBC 20474~20481).

3-1. Chuẩn bị vật liệu thử nghiệm và thiết bị

Nồi hấp HVE-50 do Hirayama sản xuất, cân điện tử HS2100A do Hansung Instrument sản xuất, tủ cấy CB-30V do Jeio Tech sản xuất, thiết bị nuôi cấy JSI-200CL do JSR sản xuất, thiết bị quang phổ tử ngoại khả kiến loại 1210 do Thermo Fisher Scientific sản xuất, quang phổ kế MQ-200 do Apogee sản xuất, và máy PCR Bio-Rad MyCycler được sử dụng. Nồi hấp được sử dụng trong điều kiện nhiệt độ 121°C và 15 phút, và thiết bị nuôi cấy được sử dụng ở nhiệt độ 37°C với cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 160 đến 200 $\mu\text{Mol m}^{-2} \text{ giây}^{-1}$ trong thời gian nuôi cấy 14~20 giờ. Môi trường LB (10g/L Trypton tinh khiết, 5g/L chiết xuất nấm men, 10g/L natri clorua, 15g/L aga tinh khiết) và kháng sinh chloramphenicol (Duchefa) được sử dụng. Chất diệt cỏ được sử dụng trong thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Nhóm chất diệt cỏ	Chất diệt cỏ (tên gốc)	Nhà sản xuất/nhà cung cấp
Pyrimidinđion	Tiafenacil	Dongbu Farm Hannong Co., Ltd./Dongbu Farm Hannong Co., Ltd.
	Saflufenacil	BASF/Sigma
	Butafenacil	Syngenta/Sigma
Điphenyl ete	Fomesafen	Syngenta/Sigma
	Acifluorfen	United Phosphorus/Supelco
	Oxyfluorfen	Dow/Sigma
N-phenylphtalimit	Flumioxazin	Sumitomo/Sigma
Triazolinon	Sulfentrazon	FMC/Waka
Oxazolidindion	Pentoxazon	Kaken/Sigma
Phenylpyrazol	Pyraflufen-etyl	Nihon Nohyaky /Sigma

Chất diệt cỏ có cấu trúc khác	Pyraclonil	Kyoyu Agri/Sigma
Oxadiazol	Oxadiazon	Bayer/Sigma
Thiadiazol	Fluthiacet-metyl	FMC/Sigma

3-2. Phương pháp thử nghiệm

Để tách dòng mỗi gen CyPPO2, CyPPO4, CyPPO8 và CyPPO12 được phân lập và khuếch đại trong ví dụ 1 vào vector pACBB (cấu trúc được thể hiện trên Fig.2), 10 μ L dung dịch chứa 4 μ L mỗi gen PPO, 3,5 μ L vector pACBB, 1 μ L dung dịch đệm 10X A, 1 μ L dung dịch đệm 10X B, 1 μ L ligaza (RBC, 3 đơn vị/ μ L) được điều chế và để phản ứng ở nhiệt độ 22°C trong 30 phút. Dung dịch phản ứng được bổ sung vào 100 μ L tế bào chủ DH5 alpha, và để phản ứng trên nước đá trong 20 phút, sau đó để ở nhiệt độ 42°C trong 40 giây. Sau đó, các tế bào được để trên nước đá trong 2 phút, sau đó môi trường canh thang LB (1mL) được bổ sung vào, sau đó ủ kết hợp lắc ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Các chủng có mỗi gen chèn trong môi trường nuôi cấy được thu nhận, sau đó nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa cloramphenicol.

Để nuôi cấy khuẩn lạc *E. coli* được chuyển gen tương ứng, các khuẩn lạc đơn của nó được nuôi cấy trên môi trường canh thang LB (3mL) chứa cloramphenicol qua đêm, và mỗi 100 μ L môi trường nuôi cấy được nuôi cấy cấp hai trong môi trường canh thang LB mới (3mL) cho đến khi độ hấp thụ (OD₆₀₀) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1. Dung dịch nuôi cấy được pha loãng 5 lần bằng môi trường canh thang LB đến độ hấp thụ (OD₆₀₀) bằng 0,5. dung dịch đã pha loãng này được pha loãng theo hệ số pha loãng 10 bằng môi trường canh thang LB. Tiếp theo, 10 μ L dung dịch pha loãng chứa chủng *E. coli* đã chuyển gen được nhỏ giọt lên môi trường thạch LB (đĩa petri) chứa cloramphenicol và nhiều dung dịch gốc chứa chất diệt cỏ ở các nồng độ khác nhau (0~ 400 μ M). Các đĩa thạch LB được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 16 đến 20 giờ nuôi cấy, hoạt tính ức chế sinh trưởng được đánh giá bằng mắt thường. Hơn nữa, hoạt tính ức chế sinh trưởng các chủng nuôi cấy trong môi trường chứa tiafenacil được đánh giá trong điều kiện ánh sáng (cường độ ánh sáng bằng 169 μ Mol m⁻² giây⁻¹) và điều kiện bóng tối.

3-3. Kết quả thử nghiệm

Fig.4-Fig.6 là các hình vẽ thể hiện kết quả đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của

CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8, và Fig.7 và Fig.8 là các hình vẽ thể hiện kết quả đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của CyPPO12.

Như được thể hiện trên Fig.3, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể đại bị ức chế sinh trưởng trên môi trường chứa tiafenacil trong điều kiện ánh sáng và bóng tối, và chủng này bị ức chế sinh trưởng trong điều kiện ánh sáng mạnh hơn điều kiện bóng tối. Ví dụ, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể đại hầu như bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ tiafenacil bằng $1\mu\text{M}$ trong điều kiện ánh sáng, nhưng chủng này vẫn sinh trưởng trong điều kiện bóng tối. Tuy nhiên, chủng này bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn ở nồng độ tiafenacil bằng $5\mu\text{M}$ hoặc cao hơn trong cả điều kiện ánh sáng lẫn điều kiện bóng tối. Kết quả là, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể đại bị ức chế sinh trưởng theo cơ chế phụ thuộc vào nồng độ tiafenacil, cho thấy tính nhạy với chất diệt cỏ. chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ tiafenacil bằng $25\mu\text{M}$, cho thấy tính kháng chất diệt cỏ.

Do đó, gen AtPPO1 thể đại được sử dụng để đánh giá PPO nhạy với chất diệt cỏ, và gen AtPPO1 đột biến được sử dụng để đánh giá PPO kháng chất diệt cỏ, và tính kháng chất diệt cỏ ức chế PPO của CyPPO2, CyPPO4 hoặc CyPPO8 được đánh giá.

Fig.4 là hình vẽ thể hiện kết quả sau khi xử lý với các nồng độ khác nhau của chất diệt cỏ ức chế PPO pyrimidindion, tức là tiafenacil, saflufenacil và butafenacil, và chất diệt cỏ ức chế PPO N-phenylphthalimit, tức là flumioxazin. Khi xử lý với tiafenacil và saflufenacil, chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ tiafenacil hoặc saflufenacil bằng $25\mu\text{M}$. Khi xử lý với butafenacil, chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến, chủng được chuyển gen CyPPO2, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ butafenacil bằng $25\mu\text{M}$. Khi xử lý với flumioxazin, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ flumioxazin bằng $25\mu\text{M}$. Khi xử lý với một trong bốn chất diệt cỏ này, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể đại bị ức chế sinh trưởng bắt đầu ở nồng độ chất diệt cỏ bằng $0,5\mu\text{M}$ và hầu như không sinh trưởng ở nồng độ chất diệt cỏ bằng $5\mu\text{M}$ hoặc cao hơn

Fig.5 là hình vẽ thể hiện kết quả sau khi xử lý với các nồng độ khác nhau của chất diệt cỏ ức chế PPO điphenyl ete, tức là fomesafen, acifluorfen và oxyfluorfen. Khi xử lý với fomesafen, chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến không bị ức chế sinh trưởng ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 25 μ M, và chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ fomesafen bằng 400 μ M. Khi xử lý với acifluorfen, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ acifluorfen bằng 400 μ M. Khi xử lý với oxyfluorfen, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ oxyfluorfen bằng 400 μ M. Khi xử lý với một trong ba chất diệt cỏ này, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể dại hầu như không sinh trưởng ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 5 μ M hoặc cao hơn.

Fig.6 là hình vẽ thể hiện kết quả sau khi xử lý với các nồng độ khác nhau của chất diệt cỏ ức chế PPO triazolinon, tức là sulfentrazon, chất diệt cỏ ức chế PPO oxazolidindion, tức là pentoxazon, chất diệt cỏ ức chế PPO phenylpyrazol, tức là pyraflufen-ethyl, chất diệt cỏ ức chế PPO oxadiazol, tức là oxadiazon, chất diệt cỏ ức chế PPO thiadiazol, tức là fluthiacet-metyl, và chất diệt cỏ ức chế PPO có cấu trúc khác, tức là pyraclonil. Khi xử lý với sulfentrazon, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ sulfentrazon bằng 400 μ M. Khi xử lý với pentoxazon, pyraflufen-ethyl, oxadiazon, fluthiacet-metyl, và pyraclonil, ức chế sinh trưởng của chủng được chuyển gen CyPPO2 và chủng được chuyển gen CyPPO8 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ oxyfluorfen bằng 400 μ M. Khi xử lý với một trong bảy chất diệt cỏ này, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể dại hầu như không sinh trưởng ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 5 μ M hoặc cao hơn.

Fig.7 là hình vẽ thể hiện kết quả đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của CyPPO12 khi xử lý với tiafenacil, saflufenacil, flumioxazin, fomesafen và oxyfluorfen. Chủng được chuyển gen CyPPO12 hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ của tiafenacil, saflufenacil, flumioxazin, fomesafen và oxyfluorfen bằng 25 μ M, và chủng này hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ fomesafen hoặc oxyfluorfen

bằng 400 μ M. Khi xử lý với oxyfluorfen, chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến bị ức chế sinh trưởng bắt đầu ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 5 μ M. Chủng này hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ của các chất diệt cỏ còn lại bằng 25 μ M. Trái lại, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể dại bị ức chế sinh trưởng bắt đầu ở nồng độ của một trong bốn chất diệt cỏ không bao gồm fomesafen bằng 0,5 μ M, và hầu như không sinh trưởng ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 5 μ M hoặc cao hơn. Khi xử lý với fomesafen, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể dại bị ức chế sinh trưởng ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 5 μ M.

Fig.8 là hình vẽ thể hiện kết quả đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của CyPPO12 khi xử lý với pyraflufen-ethyl, oxadiazon, sulfentrazon, pentoxazon và pyraclostrobin. Chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến và chủng được chuyển gen CyPPO12 không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 25 μ M, và các chủng này cũng không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ của một trong bốn chất diệt cỏ không bao gồm sulfentrazon bằng 400 μ M. Trái lại, khi xử lý với pyraflufen-ethyl, oxadiazon, sulfentrazon, hoặc pyraclostrobin, chủng được chuyển gen AtPPO1 thể dại bị ức chế sinh trưởng bắt đầu ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 0,5 μ M. Khi xử lý với pyraclostrobin, chủng này bị ức chế sinh trưởng bắt đầu ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 5 μ M và hầu như không sinh trưởng ở 25 μ M.

Ví dụ 4. Đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 trong *E.coli* không chứa gen PPO (môi trường canh thang LB)

Trong ví dụ 3, tính kháng chất diệt cỏ của chủng BT3(Δ PPO) tương ứng được chuyển gen AtPPO1 thể dại, gen AtPPO1 đột biến, gen CyPPO2, gen CyPPO4 hoặc gen CyPPO8 được đánh giá trên môi trường thạch chứa các chất diệt khác nhau, và trong ví dụ này, tính kháng chất diệt cỏ của các chủng này được đánh giá trên môi trường LB lỏng chứa các chất diệt khác nhau.

4-1. Chuẩn bị vật liệu thử nghiệm và thiết bị

Nồi hấp HV-50 do Hirayama sản xuất, cân điện tử HS2100A do Hansung Instrument sản xuất, tủ cấy CB-30V do Jeio Tech sản xuất, thiết bị nuôi cấy JSI-200CL do JSR sản xuất, quang phổ kế MQ-200 do Apogee sản xuất, và thiết bị quang phổ tử ngoại khả kiến loại 1210 do Thermo Fisher Scientific sản xuất được sử dụng. Nồi hấp được sử dụng trong điều kiện nhiệt độ 121°C và 15 phút, và thiết bị nuôi cấy được sử dụng ở nhiệt độ 37°C với cường độ chiếu sáng nằm trong khoảng từ 160 đến 200 μ Mol

$\text{m}^{-2} \text{giây}^{-1}$ trong thời gian nuôi cấy 13,5 giờ. Thiết bị quang phổ tử ngoại khả kiến được sử dụng ở bước sóng 600nm.

Tiafenacil (trọng lượng phân tử bằng 511,87g/mol), saflufenacil (trọng lượng phân tử bằng 500,85g/mol), và fomesafen (trọng lượng phân tử bằng 438,76g/mol) được sử dụng trong thử nghiệm này lần lượt do Dongbu Farm Hannong Co., Ltd, Sigma, và Sigma cung cấp. Các chất diệt cỏ này được điều chế ở nồng độ 200mM trong 100% axeton, và bảo quản tương ứng ở nhiệt độ -20°C . Môi trường Luria-Bertani (LB) (10g/L Trypton tinh khiết, 5g/L chiết xuất nấm men, 10g/L natri clorua) và kháng sinh cloramphenicol (Duchefa) được sử dụng.

4-2. Phương pháp thử nghiệm

Để nuôi cấy khuẩn lạc *E. coli* được chuyển gen tương ứng, các khuẩn lạc đơn của nó được nuôi cấy trên môi trường canh thang LB (3mL) chứa cloramphenicol trong 12 giờ, và pha loãng bằng môi trường canh thang LB đến độ hấp thụ (OD_{600}) of 1,5. Tiếp theo, cloramphenicol và 500 μL khuẩn lạc chủng *E. coli* đã chuyển gen được bổ sung vào 250mL môi trường LB lỏng, và 50mL dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào mỗi bình phản ứng dung tích 250mL. Mỗi bình phản ứng được xử lý với các nồng độ khác nhau (0 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM) của các dung dịch gốc chứa chất diệt cỏ (tiafenacil, saflufenacil, fomesafen), sau đó ủ ở nhiệt độ 37°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút. Độ hấp thụ (OD_{600}) được đo bằng thiết bị quang phổ 1,5 giờ một lần. Thử nghiệm này được lặp lại ba lần, và các giá trị trung bình được thể hiện trên đồ thị. Thanh sai số thể hiện độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại.

4-3. Kết quả thử nghiệm

Gen AtPPO1 thể dại được sử dụng để đánh giá PPO nhạy với chất diệt cỏ, và gen AtPPO1 đột biến được sử dụng để đánh giá PPO kháng chất diệt cỏ.

Kết quả xử lý với tiafenacil được thể hiện trên Fig.9.

Chúng được chuyển gen AtPPO1 thể dại hầu như không sinh trưởng ở nồng độ tiafenacil bằng 10 μM hoặc cao hơn, trong khi đó chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến sinh trưởng ở nồng độ tiafenacil bằng 10 μM , nhưng chủng này bị ức chế sinh trưởng ở nồng độ tiafenacil bằng 50 μM hoặc cao hơn. Hơn nữa, chủng được chuyển gen

CyPPO2 và chủng được chuyển gen CyPPO4 sinh trưởng bình thường ở nồng độ tiafenacil bằng 100 μ M.

Kết quả xử lý với saflufenacil được thể hiện trên Fig.10.

Ở toàn bộ các chủng đã chuyển gen, sự có mặt hoặc vắng mặt của tính kháng tương tự như kết quả xử lý với tiafenacil, nhưng tính kháng mạnh quan sát được ở các chủng được xử lý với saflufenacil, so với các chủng được xử lý với tiafenacil. Chủng được chuyển gen AtPPO1 thể đại hầu như không sinh trưởng ở nồng độ saflufenacil bằng 10 μ M hoặc cao hơn, trong khi đó chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 sinh trưởng bình thường ở nồng độ saflufenacil bằng 100 μ M.

Kết quả xử lý với fomesafen được thể hiện trên Fig.11.

Chủng được chuyển gen AtPPO1 thể đại bị ức chế sinh trưởng bắt đầu ở nồng độ fomesafen bằng 50 μ M, trong khi đó chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến, chủng được chuyển gen CyPPO2, chủng được chuyển gen CyPPO4, và chủng được chuyển gen CyPPO8 sinh trưởng bình thường ở nồng độ fomesafen bằng 100 μ M.

Ví dụ 5. Biểu hiện CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 ở thực vật

Các thử nghiệm được thực hiện để biểu hiện CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 ở thực vật, tính kháng các chất diệt cỏ ức chế PPO khác nhau của chúng đã được kiểm chứng trong ví dụ 3 và 4, và protein phát huỳnh quang (protein phát huỳnh quang màu vàng, YFP) được sử dụng để kiểm chứng biểu hiện các protein PPO này.

5-1. Phương pháp thử nghiệm

Để điều chế tế bào chủ *Agrobacterium*, chủng *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology) được nuôi cấy trên môi trường LB (5mL) ở nhiệt độ 30°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 12 giờ. Môi trường canh thang nuôi cấy này được bổ sung vào môi trường LB (200mL), sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C và tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 3~4 giờ, sau đó ly tâm ở tốc độ 3000g, nhiệt độ 4°C trong 20 phút. Hạt vi khuẩn được rửa bằng nước cất vô trùng, sau đó tạo hỗn dịch lại trong môi trường LB (20mL). Hỗn dịch vi khuẩn này (200 μ L) được kết

đông nhanh trong nitơ lỏng, sau đó bảo quản trong tủ lạnh sâu.

Để tổng hợp các vector tương ứng được tách dòng với gen AtPPO1 thể đại, gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8, vector chứa vùng khởi đầu 35S CaMV, YFP và vùng kết thúc NOS được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và XhoI, và gen mã hóa peptit vận chuyển (SEQ ID NO.26) được khuếch đại bằng phương pháp PCR được xử lý bằng enzym giới hạn XbaI và XhoI, sau đó vector và gen mã hóa peptit vận chuyển được nối với nhau để chèn peptit vận chuyển tham gia vào quá trình vận chuyển lục lạp vào vector. Hơn nữa, enzym giới hạn XhoI và BamHI được sử dụng để phân cắt các gen PPO tương ứng (gen AtPPO1 thể đại, gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8) và vector, sau đó nối với nhau để chèn các gen PPO tương ứng vào vector. Kết quả là, peptit vận chuyển được liên kết với đầu 5' của gen PPO và gen YFP được liên kết với đầu 3' của nó. Cấu trúc của vector cuối cùng được thể hiện trên Fig.12.

Tiếp theo, để chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, các tế bào chủ *Agrobacterium* điều chế nêu trên được rửa đông trên nước đá, sau đó trộn với 3~5 μ L các vector mang các gen PPO tương ứng, sau đó kết đông nhanh trong nitơ lỏng trong 2~3 phút. Sau đó, các tế bào này được rửa đông ở nhiệt độ 37°C trong 5 phút, môi trường LB (1mL) được bổ sung vào, và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 2 giờ. Mỗi chủng thu được được cấy trên môi trường LB/spectinomycin và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày.

Để lây nhiễm lá cây thuốc lá với *Agrobacterium*, các khuẩn lạc đơn *Agrobacterium* được chuyển các vector được chèn gen PPO tương ứng được nuôi cấy trên môi trường LB/spectinomycin ở nhiệt độ 30°C, tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 12 giờ, và ly tâm ở tốc độ bằng 7000 vòng/ phút trong 2 phút. Các hạt vi khuẩn thu được tương ứng được tạo hỗn dịch lại trong 10mM MgCl₂. Sau đó, độ hấp thụ của chúng (OD₆₀₀) được điều chỉnh đến 0,5, 200 μ M acetosyringon được bổ sung vào và bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. *Agrobacterium* được xâm nhiễm vào lá cây thuốc lá sinh trưởng bình thường bằng cách sử dụng bơm tiêm dung tích 1mL, và nuôi cấy trong 2-5 ngày. Tiếp theo, để phân lập các tế bào trần của lá cây thuốc lá, dung dịch enzym có thành phần như được thể hiện trong Bảng 3 hoặc Bảng 5 được điều chế.

Bảng 3

Thành phần	Hàm lượng
------------	-----------

Dung dịch gốc CPW A (100x)	5mL
Dung dịch gốc CPW B (10x)	50mL
Manitol	45g
MES	533mg
Viscozyme (Novozymes; KWN00019; 700 EGU/g Xenlulaza)	5mL
Celluclast (Novozymes; CCN03123; 100FBG/g Beta-glucanaza)	2,5mL
Pectin EX (Novozymes; KJN01013)	2,5mL
DDW	vừa đủ 500mL

Độ pH của dung dịch nêu trên được điều chỉnh đến 5,8, và vô trùng sử dụng giấy lọc có kích cỡ lỗ lọc bằng 0,22µm.

Bảng 4

Dung dịch gốc CPW A (100x)	CaCl ₂ .2H ₂ O	1460 mg/L
Dung dịch gốc CPW B (10x)	KH ₂ PO ₄	27,2 mg/L
	KNO ₃	101 mg/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	246 mg/L
	KI	0,16 mg/L
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/L
	Độ pH	5,8

Bảng 5

Thành phần	Hàm lượng
Manitol	1 g
200mM MES (pH 5,7)	150µL
viscozyme	100µL
celluclast	50µL
pectinEX	50µL
1M CaCl ₂	70µL
DDW	vừa đủ 10mL

Lá cây thuốc lá được cắt thành các mảnh lá bằng dao cạo, và các mảnh lá được tạo hỗn dịch trong dung dịch enzym đã điều chế, và phủ bằng giấy nhôm và khuấy ở nhiệt độ phòng ở tốc độ 40-50 vòng/phút trong 3-5 giờ. Kính hiển vi (Carl Zeiss Observer Z1) và hệ thống phân tích tương quan vật liệu sinh học (Zeiss LSM710) được sử dụng để đánh giá tế bào trần bằng ba loại chất chỉ thị sàng lọc, DIC, YFP và rhodamin. Các hình ảnh được chụp bằng thiết bị chụp ảnh, sau đó xử lý bằng chương trình ZEN lite 2012 (Carl Zeiss).

Protein phát huỳnh quang (YFP) được biểu hiện với protein CyPPO2, protein CyPPO4 hoặc protein CyPPO8 được đánh giá bằng phương pháp thấm tách Western. Cuối cùng, các mẫu được kết đông và bảo quản trong nitơ lỏng, sau đó phá vỡ bằng chày nhỏ. Dung dịch đệm IP [50mM Tris-Cl (độ pH = 7,5), 75mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM DTT, 1x chất ức chế proteaza] (40µL đối với giếng kích cỡ lớn)

được bổ sung vào và lắc xoáy, sau đó để trên nước đá trong 10 phút hoặc lâu hơn. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút, dịch nổi được chuyển vào ống dung tích 1,5mL mới. Chất màu hiển thị protein được bổ sung vào, đun sôi ở nhiệt độ 100°C trong 5 phút, sau đó để trên nước đá. Sau khi ly tâm, dịch nổi được sử dụng. Để điện di, dung dịch chiết xuất protein được nạp lên gel SDS-PAGE 7,5%, và protein được phân tách ở điện thế 100V đối với gel xếp chồng và ở điện thế 150V đối với gel phân tách. Protein đã điện di được chuyển lên màng polyvinyliden florua, và phong bế bằng dung dịch đệm phong bế (4% bột sữa gầy, 10mM natri phosphat, 0,15M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) trong 1 giờ. Sau đó, kháng thể liên hợp HRP kháng GFP (SantaCruz) được bổ sung vào ở tỷ lệ pha loãng 1/2000, và để phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Sau khi phản ứng với kháng thể, màng được rửa bằng dung dịch muối đệm phosphat-Tween trong 10 phút ba lần, và 500µL dung dịch phát huỳnh quang điện hóa (thành phần dung dịch đệm hoặc nhà cung cấp: Bio-Rad) được phủ lên màng và để trong 1 phút. Màng được phủ bằng phim OHP, tiếp xúc với phim X quang, sau đó phim này được hiển thị.

5-2. Kết quả thử nghiệm

Kết quả đánh giá biểu hiện gen AtPPO1 thể dại, gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 gen tương ứng sau khi chèn vào cây thuốc lá được thể hiện trên Fig.13. Khuẩn lạc *Agrobacterium* được hình thành ở các cây thuốc lá tương ứng được chuyển các gen PPO. Protein YFP đối chứng âm không được hướng đích vào lục lạp và protein YFP đối chứng âm được biểu hiện ở bào tương và nhân. Hình ảnh được hợp lưu của protein PPO và chất diệt lục tự phát huỳnh quang cho thấy rằng các tín hiệu huỳnh quang trùng khớp với nhau, và protein này được hướng đích vào lục lạp bởi peptit vận chuyển lục lạp được liên kết với đầu tận cùng N để hướng đích vào lục lạp.

Ví dụ 6. Tổng hợp vector chuyển gen thực vật và thể biến nạp

Để chọn lọc thực vật chuyển gen, vector nhị phân mang khung đọc mã mở của gen BAR (gen kháng glufosinat) và khung đọc mã mở của gen CyPPO2, gen CyPPO4 hoặc gen CyPPO8 tương ứng được tổng hợp và sử dụng. Gen BAR được sử dụng để đánh giá tác dụng xử lý chéo của các chất diệt cỏ có cơ chế tác dụng khác với chất diệt cỏ ức chế PPO. Gen này cũng được sử dụng để đánh giá xem đặc tính di truyền ổn định có xuất hiện ở thế hệ tiếp theo hay không. Để biểu hiện gen BAR, vùng khởi đầu NOS được sử

dụng, và vùng kết thúc E9 được sử dụng để kết thúc phiên mã. Trong khi đó, để cảm ứng biểu hiện CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 ở thực vật, vùng khởi đầu 35S CaMV được sử dụng, và để hướng đích các protein này vào lục lạp, vùng mã hóa peptit vận chuyển của gen AtPPO1 được chèn vào bằng cách sử dụng enzym giới hạn XbaI và XhoI. Hơn nữa, để kiểm chứng biểu hiện protein, trình tự đánh dấu hemagglutinin được chèn vào đầu 3' bằng cách sử dụng enzym giới hạn BamHI và SacI. Vùng mã hóa peptit vận chuyển được chèn vào vector có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.27 và trình tự đánh dấu hemagglutinin được chèn vào có trình tự như nêu trong SEQ ID NO.28. Gen CyPPO2 và gen CyPPO8 được chèn nằm giữa peptit vận chuyển và trình tự đánh dấu hemagglutinin bằng cách sử dụng enzym giới hạn XhoI và BamHI, và vùng kết thúc NOS được chèn vào nằm sau trình tự đánh dấu hemagglutinin để cảm ứng kết thúc phiên mã gen PPO. Cấu trúc của vector nhị phân chuyển gen thực vật này được thể hiện trên Fig.14.

Trong khi đó, thực vật chuyển gen được sản xuất như sau. Trước tiên, *Agrobacterium* đã chuyển gen được chọn lọc trên môi trường kháng sinh, sau đó các khuẩn lạc được nuôi cấy trên môi trường lỏng. Các tế bào *Agrobacterium* được thu nhận và tạo hỗn dịch trong dung dịch chứa 5% sucroza và 0,05% Silwet L-77. Độ hấp thụ (OD₆₀₀) được điều chỉnh đến 0,8, sau đó bộ phận hoa của *Arabidopsis thaliana* đã sinh trưởng trong khoảng 5-6 tuần được đặt vào dung dịch *Agrobacterium*. Để duy trì độ ẩm, chậu thử nghiệm được đậy bằng túi nhựa, và để trong 1 ngày trong bóng tối. *Arabidopsis thaliana* đã lây nhiễm với *Agrobacterium* được tiếp tục sinh trưởng trong 1-2 tháng, và các hạt giống được trưởng thành, sau đó thu hoạch. Do các hạt giống thu hoạch từ *Arabidopsis thaliana* chuyển gen là hỗn hợp chứa hạt giống chuyển gen và hạt giống không chuyển gen, nên cần chọn lọc các hạt giống chuyển gen từ các hạt giống thu hoạch được.

Theo đó, gen BAR được chèn vào để chọn lọc các cá thể *Arabidopsis thaliana* chuyển gen trong quá trình tổng hợp vector được sử dụng để chọn lọc các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen (các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen được chọn lọc bằng cách sử dụng glufosinat), được trồng vào đất và sinh trưởng để thu được *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thế hệ T₁.

Để đánh giá tính kháng chất diệt cỏ ức chế PPO của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thế hệ T₁, các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen được sinh trưởng trong

khoảng 3-4 tuần, sau đó xử lý với chất diệt cỏ trước khi chuyển sang giai đoạn kéo dài cuống hoa. *Arabidopsis thaliana* giống Col-0 bị tiêu diệt khi xử lý với 2-3mL tiafenacil ở nồng độ 1 μ M (+0,05% Silwet L-77) tính trên một thực vật. Do đó, tiafenacil ở nồng độ 1 μ M được bón đồng đều ở lượng thích hợp cho số lượng cá thể *Arabidopsis thaliana*. Sau 7 ngày, tính kháng chất diệt cỏ ức chế PPO của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen này được đánh giá. Các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen có tính kháng và sống sót được tiếp tục sinh trưởng, và hạt giống của chúng (hạt giống thế hệ T₂) được thu nhận, và các hạt giống thế hệ T₂ được nuôi cấy trên môi trường MS 1/2 trong 1 tuần, sau đó trồng vào đất để thu được *Arabidopsis thaliana* thế hệ T₂.

Ví dụ 7. Thử nghiệm nảy mầm

Để đánh giá tính kháng tiafenacil của các hạt giống thế hệ T₂ sống sót sau xử lý với tiafenacil ở nồng độ 1 μ M, trong số các thể biến nạp CyPPO2 và CyPPO8, các hạt giống *Arabidopsis thaliana* được gieo trên môi trường MS 1/2 (1,125g/L muối MS, 10g/L sucroza, 7g/L aga) chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM. *Arabidopsis thaliana* thể dại (Col-0; giống Columbia-0) có khả năng nảy mầm hạt giống giảm trên môi trường MS 1/2 chứa 50 nM tiafenacil, và *Arabidopsis thaliana* giống Col-0 không có khả năng nảy mầm bình thường và bị tiêu diệt trên môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM. Do đó, khả năng sống sót khi xử lý với tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM có nghĩa là *Arabidopsis thaliana* có tính kháng tiafenacil.

Như được thể hiện trên Fig.5, *Arabidopsis thaliana* số 1 và 49 trong số các dòng thế hệ T₂ của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 có khả năng nảy mầm, và *Arabidopsis thaliana* số 6, 16 và 40 trong số các dòng thế hệ T₂ của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8 có khả năng nảy mầm trên môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM. Hơn nữa, hạt giống *Arabidopsis thaliana* thể dại (Col-0) được sử dụng làm mẫu đối chứng âm không có khả năng nảy mầm trên môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM. *Arabidopsis thaliana* chuyển gen AtPPO1 đột biến được sử dụng làm mẫu đối chứng dương có khả năng nảy mầm ngay cả trên môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM.

Ví dụ 8. Thử nghiệm di truyền

8-1. Đánh giá tỷ lệ phân ly tính trạng của hạt giống thế hệ T₂

Tính kháng chất diệt cỏ quan sát được ở *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thể hệ tiếp theo, do đó để đánh giá khả năng di truyền, tỷ lệ phân ly tính trạng của các hạt giống thể hệ T₂ nhạy và kháng gen BAR được xác định trong mỗi dòng.

Trong trường hợp của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2, tỷ lệ phân ly tính trạng gần bằng 3:1 thu được ở dòng số 10, 20, 38, và 40 trong số 10 dòng, cho thấy rằng một bản sao của gen chuyển được tích hợp vào bộ gen, phân ly và biểu hiện theo quy tắc Mendel. 6 dòng còn lại không có tỷ lệ phân ly tính trạng bằng 3:1, cho thấy hai hoặc nhiều bản sao của gen chuyển được tích hợp vào.

Trong trường hợp của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8, tỷ lệ phân ly tính trạng gần bằng 3:1 thu được ở dòng số 6, 16, và 40 trong số 5 dòng, cho thấy rằng một bản sao của gen chuyển được tích hợp vào bộ gen, phân ly và biểu hiện theo quy tắc Mendel. 2 dòng còn lại có tỷ lệ phân ly tính trạng nhỏ hơn 3:1.

Bảng 6

Thế biến nạp CyPPO2-Hemagglutinin (T ₂)	
Dòng số	Tỷ lệ phân ly tính trạng
1	4,56:1
8	1,56:1
10	2,85:1
20	2,70:1
23	1,5:1
30	1,7:1
35	2,03:1
38	2,57:1
40	3,17:1
49	2,41:1

Bảng 7

Thế biến nạp CyPPO8-Hemagglutinin (T ₂)	
Dòng số	Tỷ lệ phân ly tính trạng
6	2,57:1
16	2,85:1
23	2,23:1
38	2,03:1
40	2,85:1

8-2. Đánh giá biểu hiện protein CyPPO2 và protein CyPPO8 ở hạt giống thể hệ T₂ kháng chất diệt cỏ

Để đánh giá xem protein CyPPO2 và protein CyPPO8 có được biểu hiện duy trì ở

thể hệ tiếp theo hay không, protein được chiết xuất từ từ mỗi dòng thể hệ T_2 của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen, sau đó thẩm tách Western. Để định lượng protein PPO chứa trình tự đánh dấu hemagglutinin, protein được chiết xuất từ lá *Arabidopsis thaliana* (khoảng 100mg), sau đó điện di. Các protein này được chuyển lên màng PVDF, sau đó phân tích thẩm tách Western được thực hiện sử dụng kháng thể kháng hemagglutinin. Tiafenacil ($1\mu\text{M}$) được phun lên các *Arabidopsis thaliana* thể hệ T_1 . Các *Arabidopsis thaliana* sống sót được phân loại là có tính kháng, và các *Arabidopsis thaliana* bị tiêu diệt được phân loại là có tính nhạy cảm.

Trong trường hợp của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2, protein PPO được phát hiện ở dòng số 8, 23, 30, 38, 40 và 49 có tính kháng chất diệt cỏ, và không được phát hiện ở các dòng nhạy cảm (Fig.16). Trong trường hợp của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8, protein PPO được phát hiện ở dòng số 6, 23, 38, và 40 có tính kháng chất diệt cỏ, và không được phát hiện ở các dòng nhạy cảm (Fig.17). Các kết quả này cho thấy rằng protein CyPPO2 và protein CyPPO8 được biểu hiện duy trì ở các thể hệ tiếp theo của các dòng có tính kháng chất diệt cỏ.

8-3. Đánh giá khả năng gen chuyển được di truyền ổn định bằng cách sử dụng gen BAR

Gen chuyển được di truyền ổn định cho thể hệ tiếp theo được đánh giá bằng cách đánh giá khả năng tích hợp của gen chuyển, tức gen BAR vào bộ gen. Các ADN bộ gen được phân lập từ lá của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 và CyPPO8 (100mg), sau đó khả năng tích hợp của gen BAR được đánh giá bằng phương pháp PCR. Kết quả là, gen BAR được tích hợp vào bộ gen của ở cả dòng kháng lẫn nhạy cảm với tiafenacil của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 và *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8, cho thấy gen chuyển được di truyền ổn định cho thể hệ tiếp theo.

Ví dụ 9. Đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen

Để đánh giá xem tính kháng chất diệt cỏ được duy trì ở các thể hệ tiếp theo của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen hay không, các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thể hệ T_2 tương ứng của *Arabidopsis thaliana* được chuyển gen CyPPO2, gen CyPPO4 và gen CyPPO8 được đánh giá tính kháng chất diệt cỏ. 2~3mL 0,5 μM tiafenacil, 1 μM saflufenacil, hoặc 3 μM fomesafen được phun lên mỗi *Arabidopsis thaliana* đã sinh

trưởng trong khoảng 4 tuần. Sau 7 ngày phun, các *Arabidopsis thaliana* thể đại Col-0 bị tiêu diệt, trong khi đó nhóm đối chứng dương, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen AtPPO1 đột biến và các nhóm thử nghiệm, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO4 và *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8 tiếp tục sinh trưởng mà không bị tổn thương (Fig.18 và Fig.19), cho thấy rằng tính kháng chất diệt cỏ của các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thế hệ T₁ được di truyền cho các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thế hệ T₂.

Ví dụ 10. Thử nghiệm sử dụng chéo nhiều chất diệt cỏ có cơ chế tác dụng khác nhau

Ở *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 hoặc gen CyPPO8 thu được bằng phương pháp chuyển gen sử dụng vector chuyển gen thực vật được tổng hợp trong ví dụ 6, gen kháng chất diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO và gen kháng glufosinat được biểu hiện đồng thời. Do đó, thử nghiệm xử lý chéo *Arabidopsis thaliana* chuyển gen với hai chất diệt cỏ, tức là chất diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO và glufosinat được đánh giá xem có hiệu quả để kiểm soát cỏ dại hay không. Cuối cùng, các hạt giống của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 và gen BAR, hoặc *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8 và gen BAR được vô trùng và xử lý ở nhiệt độ 4°C trong 2 ngày. Các hạt giống được gieo trong môi trường MS 1/2 (Duchefa), môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM, môi trường MS 1/2 chứa glufosinat ở nồng độ bằng 50µM, hoặc môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM và glufosinat ở nồng độ bằng 50µM, và sinh trưởng ở nhiệt độ 23°C trong điều kiện 16 giờ chiếu sáng/8 giờ trong bóng tối trong 7~14 ngày. *Arabidopsis thaliana* trên môi trường chất diệt cỏ là hạt giống chuyển gen CyPPO2 hoặc CyPPO8 và thể đại Col0 là mẫu đối chứng, tương ứng. *Arabidopsis thaliana* chuyển gen và *Arabidopsis thaliana* đối chứng được nuôi cấy trên môi trường chất diệt cỏ. Sau 2 tuần, chúng được đánh giá. Kết quả là, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 và *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8 sinh trưởng bình thường trên môi trường bổ sung glufosinat, môi trường bổ sung tiafenacil, hoặc môi trường bổ sung glufosinat và tiafenacil, trong khi đó *Arabidopsis thaliana* đối chứng Col0 không nảy mầm (xem Fig.20).

Các kết quả này cho thấy rằng khi các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen được sản xuất bằng cách tái tổ hợp gen kháng chất diệt cỏ ức chế PPO theo sáng chế và gen BAR

trong vector nhị phân, và xử lý chéo hoặc kép các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen này với chất diệt cỏ có cơ chế tác dụng khác nhau được thực hiện, các thực vật không mong muốn có thể được kiểm soát.

Trong ví dụ này, gen BAR được chèn vào dưới dạng gen tái tổ hợp, cùng với gen CyPPO, chỉ minh họa cho gen kháng chất diệt cỏ, và không có giới hạn cụ thể về loại gen được sử dụng theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng khi gen kháng chất diệt cỏ thích hợp để sử dụng và gen CyPPO2, gen CyPPO4, gen CyPPO8 hoặc gen CyPPO12 được tái tổ hợp với vector nhị phân, và các chất diệt cỏ bị kháng bởi các gen tương ứng được xử lý chéo, tính kháng mong muốn có thể thu được.

Ví dụ 11. Thử nghiệm sử dụng chéo nhiều chất diệt cỏ ức chế PPO

Trong ví dụ 9, đã kiểm chứng được rằng *Arabidopsis thaliana* chuyển gen theo sáng chế có tính kháng hai chất diệt cỏ ức chế PPO, tiafenacil và saflufenacil đồng thời, do đó thử nghiệm xử lý chéo *Arabidopsis thaliana* chuyển gen với tiafenacil và saflufenacil được đánh giá xem có hiệu quả để kiểm soát cỏ dại hay không. Cuối cùng, các hạt giống của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 hoặc gen CyPPO8 được vô trùng và xử lý ở nhiệt độ 4°C trong 2 ngày. Các hạt giống được gieo trong môi trường MS 1/2, môi trường MS 1/2 chứa tiafenacil ở nồng độ bằng 70nM, môi trường MS 1/2 chứa saflufenacil ở nồng độ bằng 70nM, hoặc môi trường MS 1/2 chứa 35nM tiafenacil và 35nM saflufenacil, và sinh trưởng ở nhiệt độ 23°C trong điều kiện 16 giờ chiếu sáng/8 giờ trong bóng tối trong 7~14 ngày. *Arabidopsis thaliana* trên môi trường chất diệt cỏ là hạt giống chuyển gen CyPPO2 hoặc CyPPO8 và thể dại Col0 là mẫu đối chứng, tương ứng. *Arabidopsis thaliana* chuyển gen và *Arabidopsis thaliana* đối chứng được nuôi cấy trên môi trường chất diệt cỏ. Sau 2 tuần, chúng được đánh giá. Kết quả là, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO2 và *Arabidopsis thaliana* chuyển gen CyPPO8 sinh trưởng bình thường trên môi trường bổ sung tiafenacil, môi trường bổ sung saflufenacil, hoặc môi trường bổ sung tiafenacil và saflufenacil, trong khi đó *Arabidopsis thaliana* đối chứng Col0 không nảy mầm (xem Fig.21).

Các kết quả này cho thấy rằng khi các *Arabidopsis thaliana* chuyển gen được sản xuất sử dụng gen kháng chất diệt cỏ ức chế PPO theo sáng chế, và xử lý chéo hoặc kép nhiều chất diệt cỏ ức chế PPO cũng như xử lý một chất diệt cỏ ức chế PPO được thực

hiện, các thực vật không mong muốn có thể được kiểm soát.

Ví dụ 12. Đánh giá tính kháng chất diệt cỏ theo độ tương đồng trình tự axit amin của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8

Để kiểm chứng độ tương đồng trình tự axit amin của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 duy trì tính kháng chất diệt cỏ, một đoạn trình tự axit amin của CyPPO2, CyPPO4 hoặc CyPPO8 protein được thay bằng một đoạn trình tự axit amin của NtPPO (gen PPO có nguồn gốc từ thuốc lá). Kết quả là, trình tự axit amin của biến thể CyPPO2 thu được như nêu trong SEQ ID NO.12, và trình tự nucleotit của nó như nêu trong SEQ ID NO.13. Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của biến thể CyPPO2 có độ tương đồng bằng 98% so với CyPPO2, tương ứng. Hơn nữa, trình tự axit amin của biến thể CyPPO4 như nêu trong SEQ ID NO.14, và trình tự nucleotit của nó như nêu trong SEQ ID NO.15. Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của biến thể CyPPO4 có độ tương đồng bằng 98% so với CyPPO4, tương ứng. Hơn nữa, trình tự axit amin của biến thể CyPPO8 như nêu trong SEQ ID NO.16, và trình tự nucleotit của nó như nêu trong SEQ ID NO.17. Trình tự axit amin và trình tự nucleotit của biến thể CyPPO8 có độ tương đồng bằng 98% so với CyPPO8, tương ứng.

Tính kháng chất diệt cỏ của biến thể trình tự axit amin CyPPO2, biến thể trình tự axit amin CyPPO4, và biến thể trình tự axit amin CyPPO8 được đánh giá trong chủng *E. coli* BT3 không chứa gen PPO [BT3(Δ PPO)], và phương pháp thử nghiệm đặc hiệu là tương tự như phương pháp trong ví dụ 3. Tương tự như phương pháp trong ví dụ 3, PPO thể đại (AtPPO1 thể đại) của *Arabidopsis thaliana* được sử dụng làm mẫu đối chứng âm để đánh giá tính nhạy với chất diệt cỏ. AtPPO1 đột biến được tổng hợp bằng cách thay thế axit amin Y426M và S305L trong trình tự axit amin thể đại được sử dụng làm mẫu đối chứng dương để đánh giá tính kháng chất diệt cỏ.

12-1. Chuẩn bị vật liệu thử nghiệm và thiết bị

Nồi hấp được sử dụng trong điều kiện nhiệt độ 121°C và 15 phút, và thiết bị nuôi cấy được sử dụng ở nhiệt độ 37°C với cường độ chiếu sáng bằng 169 μ Mol m⁻² giây⁻¹ trong thời gian nuôi cấy 14~16 giờ. Thiết bị quang phổ tự ngoại khả kiến được sử dụng ở bước sóng 600nm. Phản ứng PCR được thực hiện trong các điều kiện ở nhiệt độ 94°C trong 4 phút, và 25 chu trình (ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ở nhiệt độ 56~60°C trong 30

giây và ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút), ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút và ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút. Chất diệt cỏ được sử dụng trong thử nghiệm này được thể hiện trong Bảng 8. Các chất diệt cỏ tương ứng được điều chế ở nồng độ bằng 200mM trong DMSO, và bảo quản ở nhiệt độ -20°C. Trước khi sử dụng, các chất diệt cỏ được pha loãng và bổ sung vào môi trường canh thang LB (chứa 34mg/mL cloramphenicol).

Bảng 8

Nhóm chất diệt cỏ	Chất diệt cỏ (tên gốc)	Nhà sản xuất/nhà cung cấp
Pyrimidinđion	Tiafenacil	Dongbu Farm Hannong Co., Ltd./Dongbu Farm Hannong Co., Ltd.
	Saflufenacil	BASF/Sigma
	Butafenacil	Syngenta/Sigma
Điphenyl ete	Fomesafen	Syngenta/Sigma
	Acifluorfen	United Phosphorus/Supelco
	Oxyfluorfen	Dow/Sigma
N-phenylphtalimit	Flumioxazin	Sumitomo/Sigma
Triazolinon	Sulfentrazon	FMC/Waka
Oxizolidindion	Pentoxazon	Kaken/Sigma
Phenylpyrazol	Pyraflufen-etyl	Nihon Nohyaky/Sigma
Chất diệt cỏ có cấu trúc khác	Pyraclonil	Kyoyu Agri/Sigma
Oxadiazol	Oxadiazon	Bayer/Sigma
Thiadiazol	Fluthiacet-metyl	FMC/Sigma

12-2. Phương pháp thử nghiệm

Các tế bào bảo hòa được cấy vào 3mL môi trường LB lỏng chứa cloramphenicol, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, tốc độ bằng 200 vòng/phút trong 5 giờ. Mật độ tế bào nuôi cấy được đo ở bước sóng 600nm, và các thể biến nạp này được pha loãng bằng môi trường LB lỏng để có cùng độ hấp thụ (OD_{600}) tính trên 1mL của nó ($OD_{600}=0,5$). Aga được bổ sung vào môi trường LB lỏng ở nồng độ bằng 1%, sau đó khử trùng bằng nồi hấp. Cloramphenicol (34µg/ml) và chất diệt cỏ được bổ sung vào và trộn. Các tế bào được pha loãng tương đương ở mật độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , và 10^{-5} . Mỗi 10µL tế bào được nhỏ giọt lên 1% aga, môi trường LB rắn, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị nuôi cấy trong 14~16 giờ (cường độ ánh sáng: $169\mu\text{Mol m}^{-2} \text{giây}^{-1}$).

Các vector pACBB-CyPPO2, pACBB-CyPPO4 và pACBB-CyPPO8 được sử dụng làm khuôn để tổng hợp các đoạn môi đặc hiệu cho vùng cần thay thế (Bảng 9), và phản ứng PCR được thực hiện để tổng hợp các vector biến thể pACBB-CyPPO2, biến thể pACBB-CyPPO4 và biến thể pACBB-CyPPO8. Hỗn hợp phản ứng PCR (50 μ L) được điều chế bằng cách trộn 1 μ L mỗi khuôn (pACBB-CyPPO2, pACBB-CyPPO4 và pACBB-CyPPO8 ban đầu), 5 μ L dung dịch đệm 10X, 1 μ L hỗn hợp dNTP (mỗi 10mM), 1 μ L đoạn môi xuôi (10 μ M), 1 μ L đoạn môi ngược (10 μ M), 35 μ L DDW, và 1 μ L Pfu-X (Solgent, 2,5 đơn vị/ μ L), và phản ứng khuếch đại được thực hiện trong các điều kiện ở nhiệt độ 94°C trong 4 phút, và 25 chu trình (ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, ở nhiệt độ 56°C trong 30 giây và ở nhiệt độ 72°C trong 3 phút), ở nhiệt độ 72°C trong 5 phút và ở nhiệt độ 4°C trong 5 phút.

Bảng 9

Chủng	Đoạn môi	Trình tự để tách dòng pACBB	SEQ ID NO.
<i>Oscillatoria nigroviridis</i> PCC 7112	CyPPO2Nt98%_F	ATCTGATCAAAAAGCAATTTTCTGAGTTTTC CGGGGAAAC	29
	CyPPO2Nt98%_R	CAATTGGATTGAAGGTAA CGGTTGCAGCTTATTTTCC	30
<i>Lyngbya sp.</i> PCC 8106	CyPPO4-Nt-98%_F	ATCTGATCAAAAAGCAATTTTTTAAGTCCTG GAGGTAAACT	31
	CyPPO4-Nt-98%_R	CAATTGGATTGAAGGTAA AGGCATGAGTTGACCATTC	32
<i>Halotheca sp.</i> PCC 7418	CyPPO8_Nt98%-F	ATCTGATCAAAAAGCAATTTTCTGAGTCCAA TCGGGAAAC	33
	CyPPO8_Nt98%-R	CAATTGGATTGAAGGTAAAGGGCGCAGTT TCCCCTCCC	34

Để tổng hợp tế bào chủ BT3(Δ PPO), chủng BT3(Δ PPO) được bổ sung vào môi trường canh thang LB (5mL) chứa 50 μ g/ml kanamycin và 20 μ g/ml hematin, và nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị nuôi cấy trong 12 giờ trong bóng tối. Sau đó, 5mL dung dịch nuôi cấy được bổ sung vào môi trường canh thang LB (100mL) chứa 20 μ g/ml hematin, và nuôi cấy lắc ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị nuôi cấy trong bóng tối cho đến khi OD₆₀₀ bằng 0,5. Các tế bào chủ BT3(Δ PPO) được điều chế từ E. coli đã nuôi cấy sử dụng CaCl₂ theo quy trình điều chế tế bào chủ. Tiếp theo, để chuyển các vector tương ứng mang biến thể CyPPO2, biến thể CyPPO4 và biến thể CyPPO8 vào chủng BT3(Δ PPO), 5 μ L vector được bổ sung vào 100 μ L tế bào chủ BT3(Δ PPO), và hỗn hợp được trộn kỹ, để phản ứng trên nước đá trong 20 phút, sau đó để ở nhiệt độ 42°C trong 40 giây. Sau khi để ổn định trên nước đá trong 2 phút, môi trường canh thang LB (1mL) được bổ sung vào BT3(Δ PPO), và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ kết hợp lắc. Tế bào nuôi cấy trên

môi trường được thu nhận theo loại gen chèn vào, sau đó cấy trải lên môi trường LB rắn chứa cloramphenicol (34 μ g/ml), và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ hoặc lâu hơn. Sau đó, các khuẩn lạc đơn của nó được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng. Hoạt tính ức chế sinh trưởng được đo theo chất diệt cỏ xử lý trong điều kiện ánh sáng, và so với chủng BT3 chuyển gen được nuôi cấy trên môi trường LB rắn không chứa chất diệt cỏ, và sự sinh trưởng của chủng BT3 chuyển gen trên môi trường LB rắn chứa các nồng độ khác nhau của chất diệt cỏ được đánh giá.

12-3. Kết quả thử nghiệm

Fig.22-Fig.25 là các hình vẽ thể hiện kết quả đánh giá tính kháng chất diệt cỏ của các gen biến thể CyPPO2, biến thể CyPPO4 và biến thể CyPPO8 có độ tương đồng trình tự bằng 98% so với các trình bản đầu của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8, tương ứng. AtPPO1 thể dại được sử dụng làm mẫu đối chứng âm để đánh giá tính nhạy với chất diệt cỏ. AtPPO1 đột biến được sử dụng làm mẫu đối chứng dương để đánh giá tính kháng chất diệt cỏ. Khi chủng có tính kháng tương đương hoặc cao hơn chủng được chuyển gen AtPPO1 đột biến, thì chủng này được khẳng định là có tính kháng chất diệt cỏ.

Kết quả là, các chủng BT3 tương ứng được chuyển biến thể CyPPO2, biến thể CyPPO4 và biến thể CyPPO8 sinh trưởng mạnh trong điều kiện ánh sáng trên toàn bộ 13 loại chất diệt cỏ từ 9 nhóm (tiafenacil, saflufenacil, butafenacil, fomesafen, acifluorfen, oxyfluorfen, flumioxazin, sulfentrazone, pentoxazon, pyraflufen-ethyl, pyraclostrobin, oxadiazon, fluthiacet-methyl), và chúng có tính kháng chất diệt cỏ tương đương hoặc cao hơn nhóm đối chứng dương AtPPO1 đột biến (các chủng này hầu như không bị ức chế sinh trưởng ngay cả ở nồng độ chất diệt cỏ bằng 25 μ M).

Do đó, biến thể CyPPO2, biến thể CyPPO4 và biến thể CyPPO8 có độ tương đồng trình tự bằng 98% so với CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 cũng có tính kháng chất diệt cỏ tương đương hoặc cao hơn CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8, cho thấy rằng mặc dù một đoạn trình tự của CyPPO2, CyPPO4 hoặc CyPPO8 được thay thế, thì hoạt tính sinh học và chức năng của gen PPO liên quan đến tính kháng chất diệt cỏ vẫn được duy trì.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo tính kháng chất diệt cỏ cho thực vật hoặc tảo, bao gồm bước chuyển gen tảo, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc thực vật với trình tự nucleotit mã hóa polypeptit cấu thành từ trình tự axit amin SEQ ID NO.5, trong đó chất diệt cỏ được chọn từ nhóm bao gồm tiafenacil, saflufenacil, butfenacil, flumioxazin, fomesafen, actifluorfen, oxyfluorfen, sulfentrazone, pentoxazon, pyraflufen-ethyl, oxadiazon, fluthiacet-metyl, pyraclonil, và hỗn hợp của chúng.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit này cấu thành từ trình tự nucleotit SEQ ID NO.6 hoặc trình tự nucleotit có độ tương đồng bằng 95% hoặc cao hơn so với trình tự có chiều dài đầy đủ này.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa này được chứa trong vector biểu hiện tái tổ hợp có nguồn gốc thực vật hoặc vector biểu hiện tái tổ hợp có nguồn gốc tảo.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thực vật này là thực vật một lá mầm, thực vật hai lá mầm, thực vật thân thảo, hoặc thực vật thân gỗ.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thực vật hoặc tảo này còn chứa trình tự nucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kháng chất diệt cỏ tạo ra tính kháng chất diệt cỏ thứ hai.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chất diệt cỏ thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm glyphosat, glufosinat, dicamba, axit 2,4-diclophenoxyaxetic, isoxaflutol, chất diệt cỏ ức chế axetolactat synthaza, chất diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II, chất diệt cỏ phenylure, chất diệt cỏ bromoxynil, và hỗn hợp của chúng.
7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm EPSPS (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza), glyphosat decarboxylaza, PAT (phosphinothricin-N-axetyltransferaza), DMO (monooxygenaza), 2,4-D-monooxygenaza, AAD (aryloxyalkanoat dioxygenaza), AHAS (axit axetohydroxy synthaza), AtAHASL (axit axetohydroxy synthaza tiểu đơn vị mạch dài), protein D1 hệ quang hóa II, cytochrom P450, HPPD (hydroxylphenylpyruvat dioxygenaza), nitrilaza và hỗn hợp của chúng.

8. Phương pháp theo điểm 5, trong đó trình tự nucleotit mã hóa polypeptit kháng chất diệt cỏ thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm CP4 EPSPS, MEPSPS, 2MEPSPS, GOXV247, GAT4601, GAT4621, BAR, PAT, DMO, ADD-1, AAD-12, HPPDPF W336, ALS, SCR1, CSR1-1, CSR1-2, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, SURA, SURB, PSBA, CYP76B 1 kháng chất diệt cỏ phenylurea, BXN, và hỗn hợp của chúng.

9. Thể biến nạp, sản phẩm tách dòng hoặc thể biến nạp thế hệ sau của nó, có tính kháng chất diệt cỏ, chứa trình tự nucleotit như nêu trong điểm 1.

10. Thể biến nạp, sản phẩm tách dòng hoặc thể biến nạp thế hệ sau của nó theo điểm 9, trong đó thể biến nạp này là tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc thực vật.

11. Phương pháp sản xuất thực vật hoặc tảo có tính kháng chất diệt cỏ, bao gồm bước chuyển gen thực vật, tế bào thực vật, tế bào trần, mô sẹo, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc tảo với trình tự nucleotit như nêu trong điểm 1.

12. Phương pháp kiểm soát cỏ dại ở vùng đất trồng trọt, bao gồm bước trồng thực vật chứa trình tự nucleotit như nêu trong điểm 1 trên vùng đất trồng trọt, và bước bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào vùng đất trồng trọt.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào vùng đất trồng trọt được thực hiện bằng cách bón kết hợp hai hoặc nhiều chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza ở lượng hữu hiệu của chúng, luân phiên hoặc đồng thời.

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó thực vật này còn chứa trình tự nucleotit thứ hai mã hóa polypeptit kháng chất diệt cỏ tạo ra tính kháng chất diệt cỏ thứ hai, và phương pháp này còn bao gồm bước bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và chất diệt cỏ thứ hai lên vùng đất trồng trọt, luân phiên hoặc đồng thời.

15. Phương pháp kiểm soát loài thủy sinh không mong muốn trong môi trường canh tác, bao gồm bước nuôi trồng với tảo trình tự nucleotit như nêu trong điểm 1 trên môi trường canh tác, và bước bón lượng hữu hiệu của chất diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza vào môi trường canh tác.



Fig.1

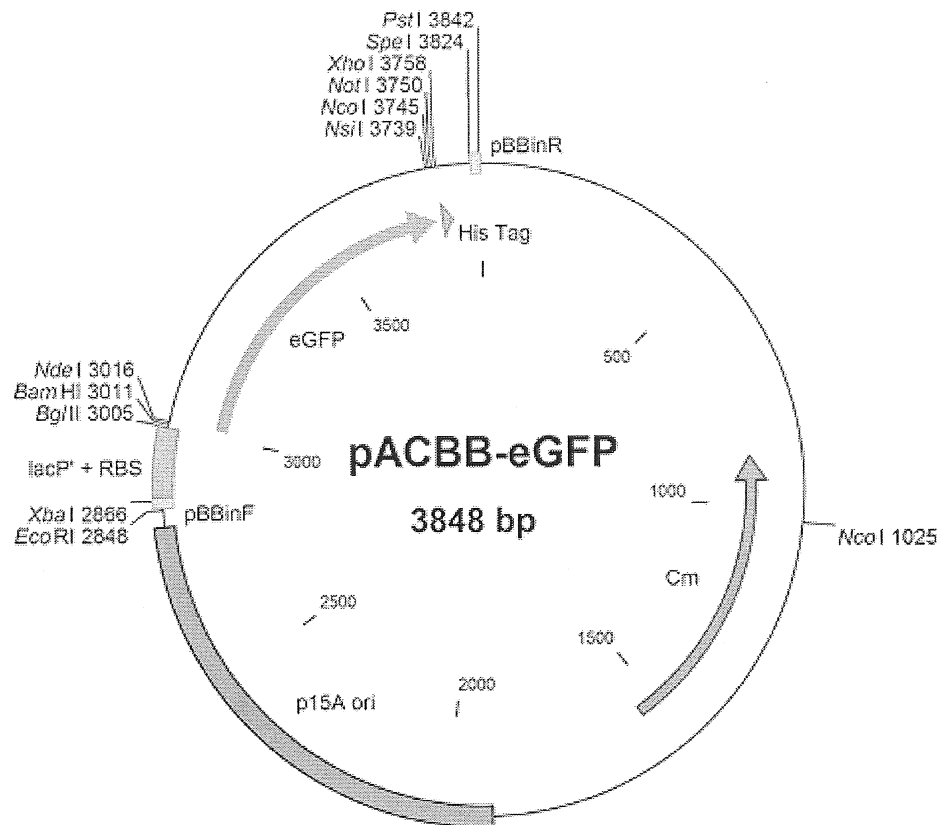
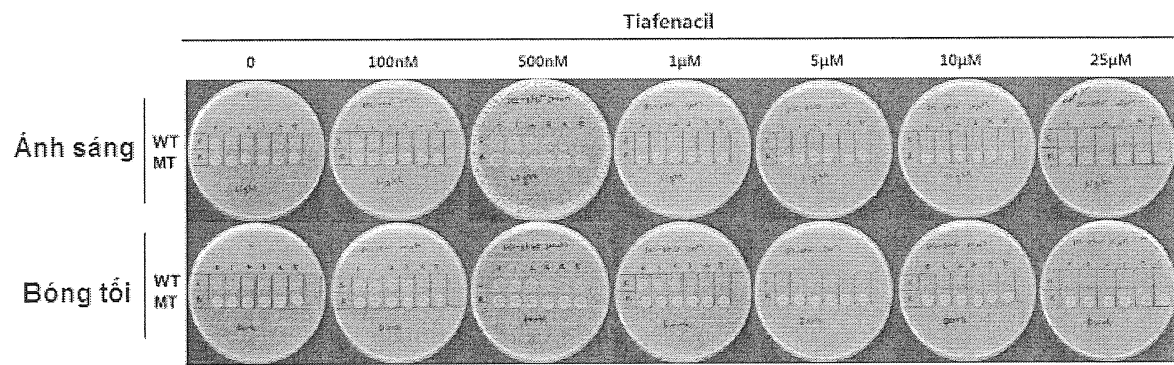


Fig.2

**Fig.3**

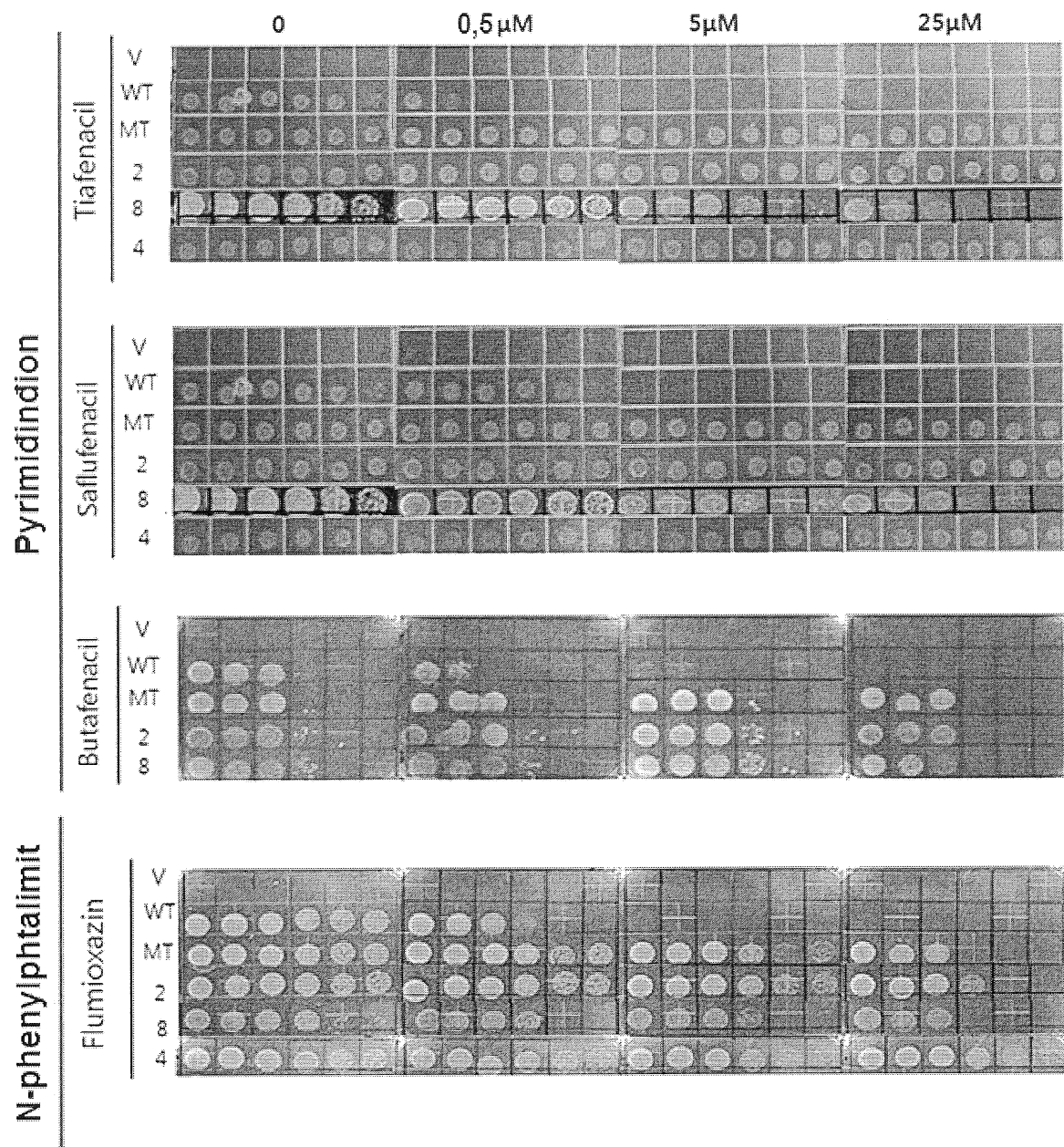


Fig.4

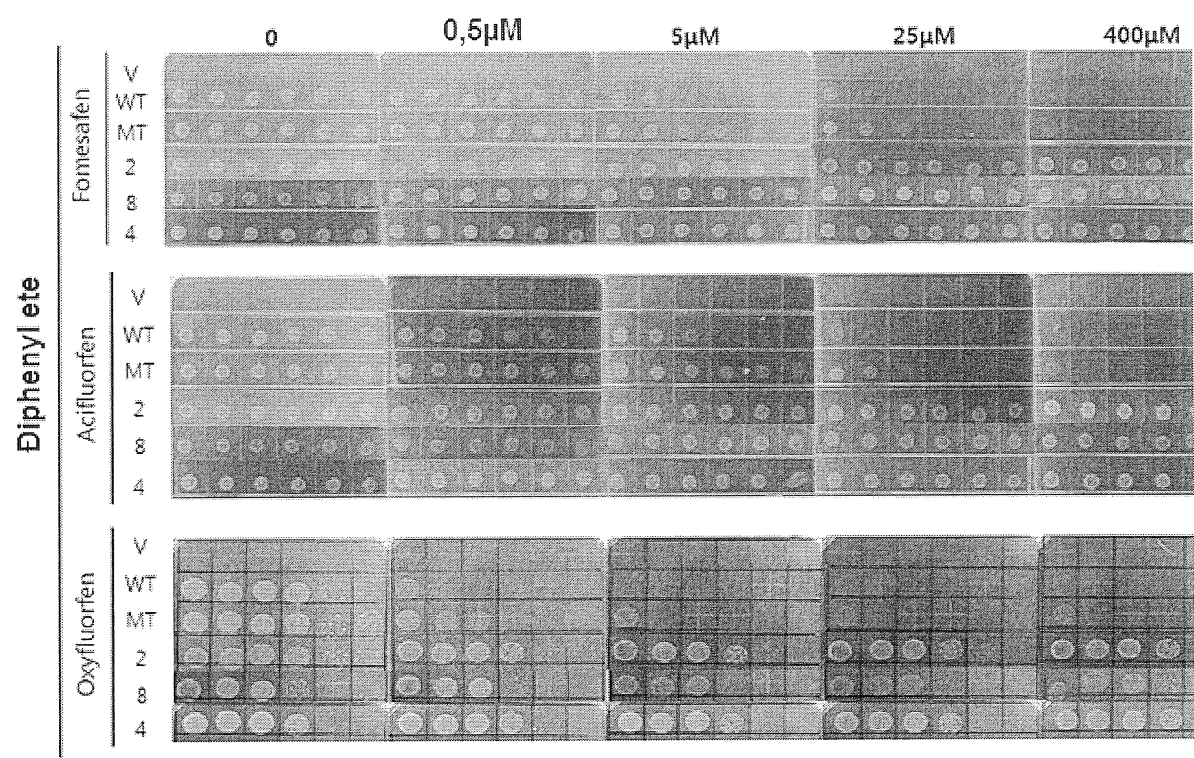
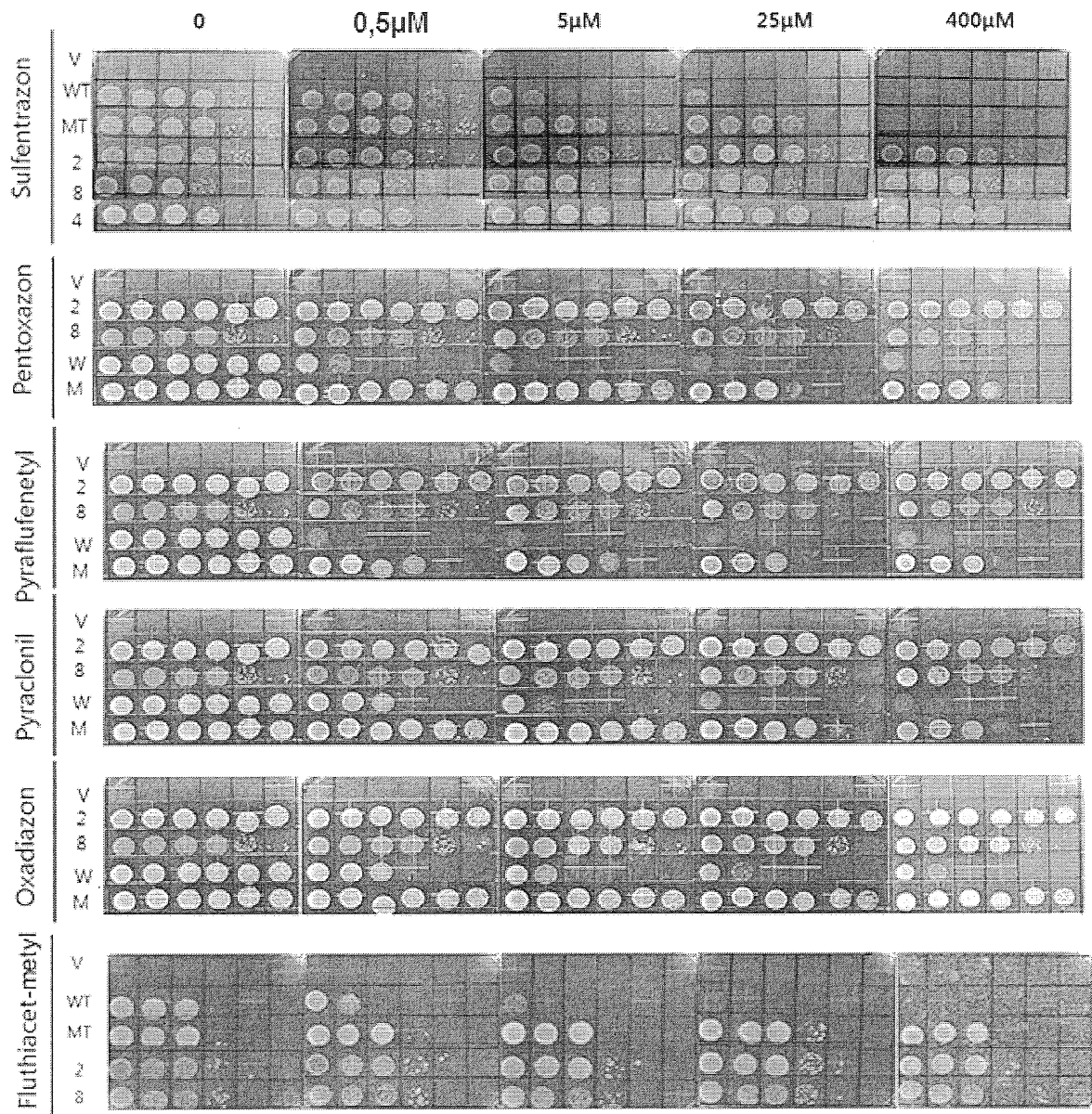
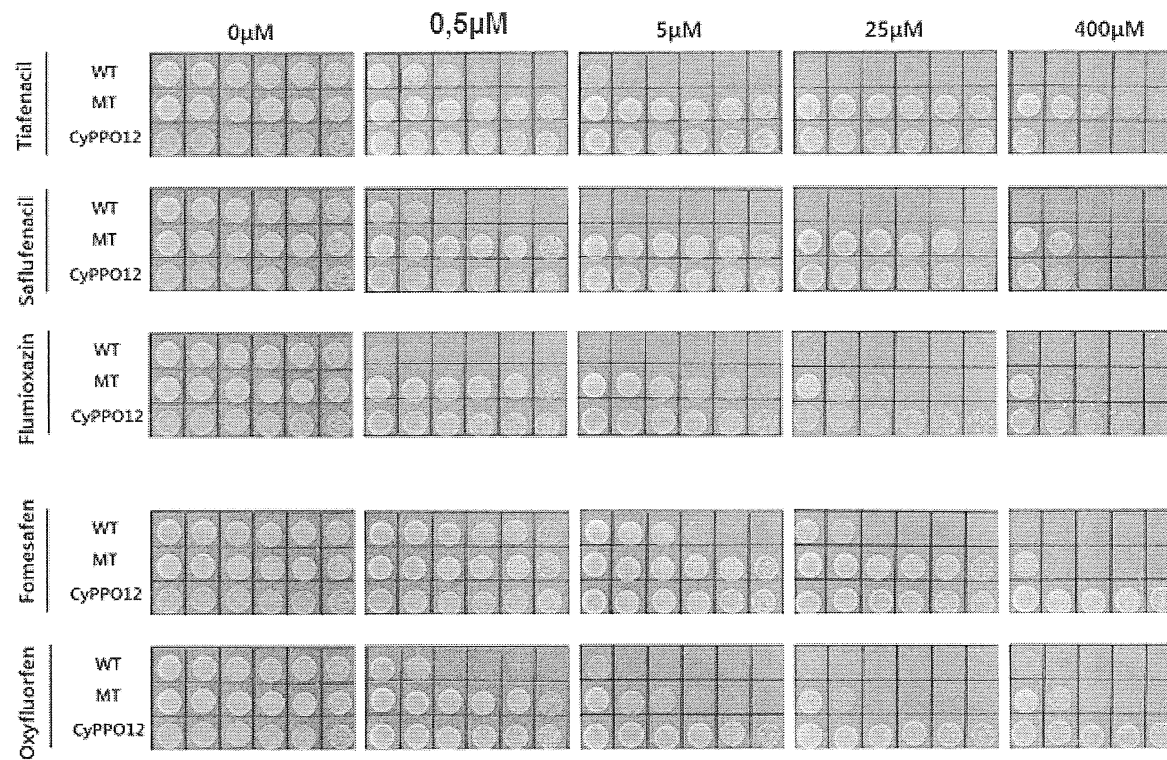


Fig.5

**Fig.6**

**Fig.7**

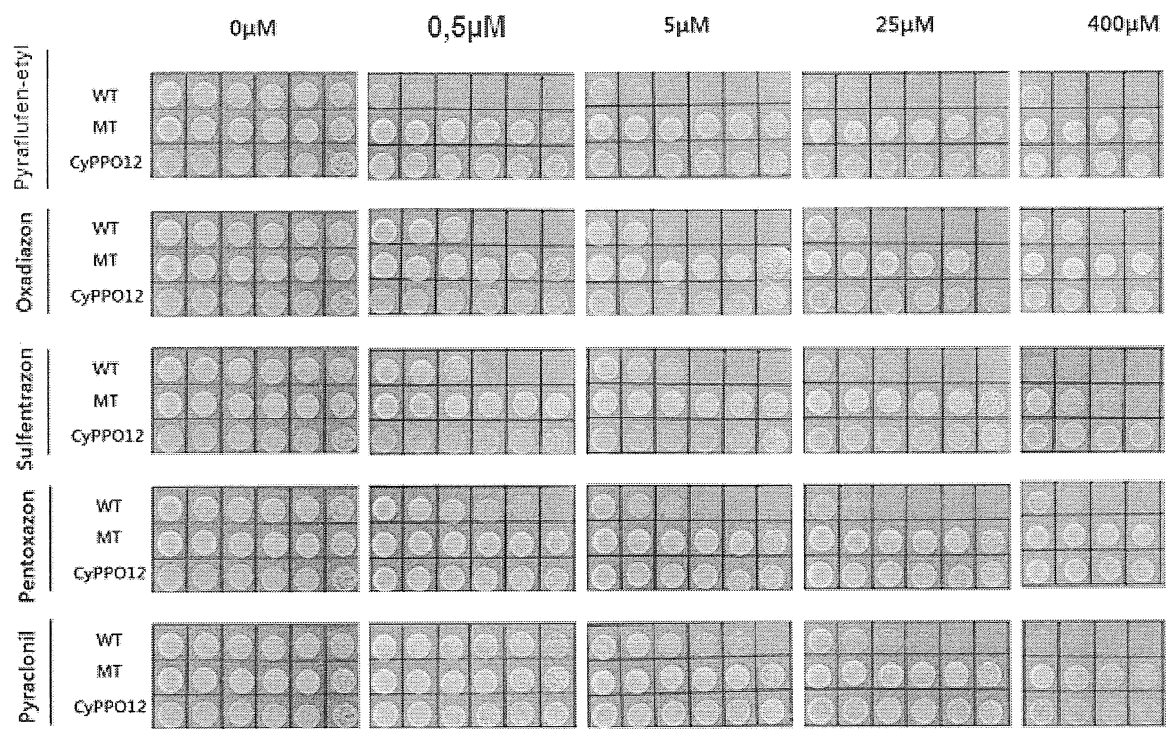
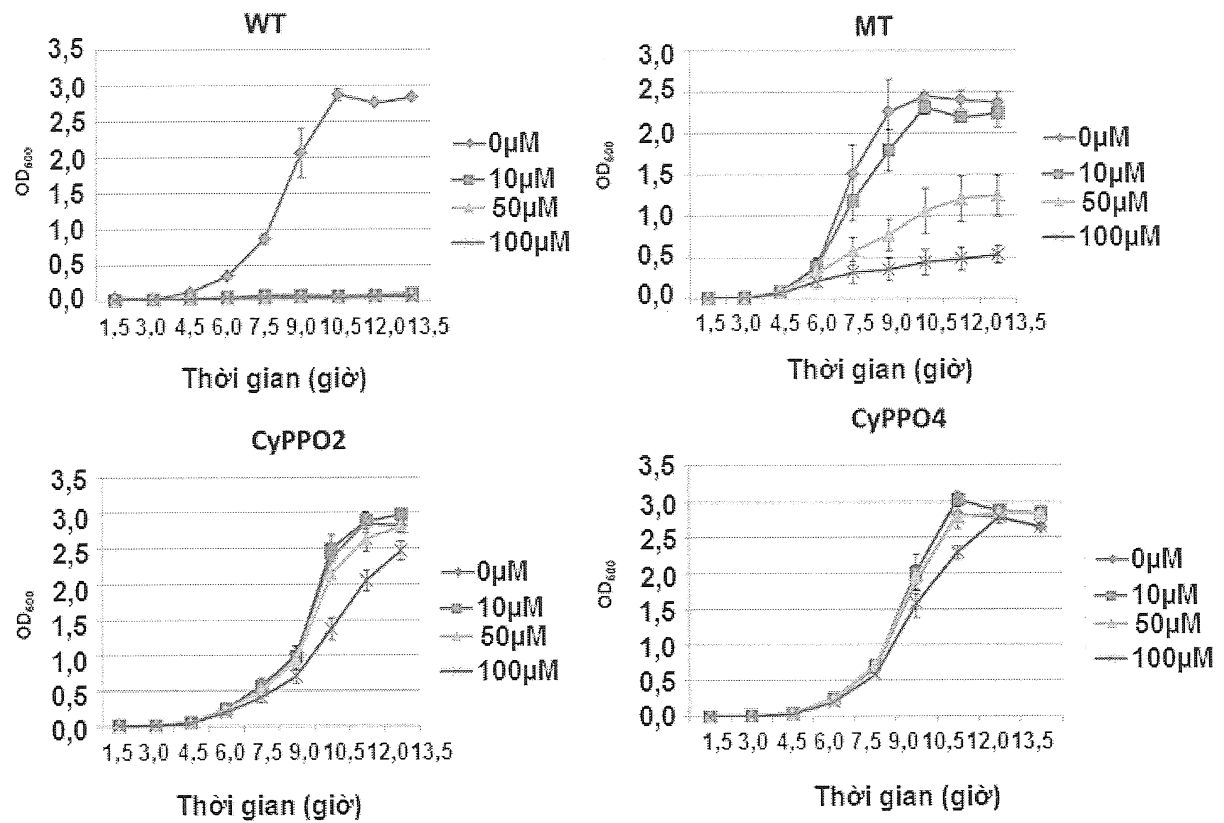
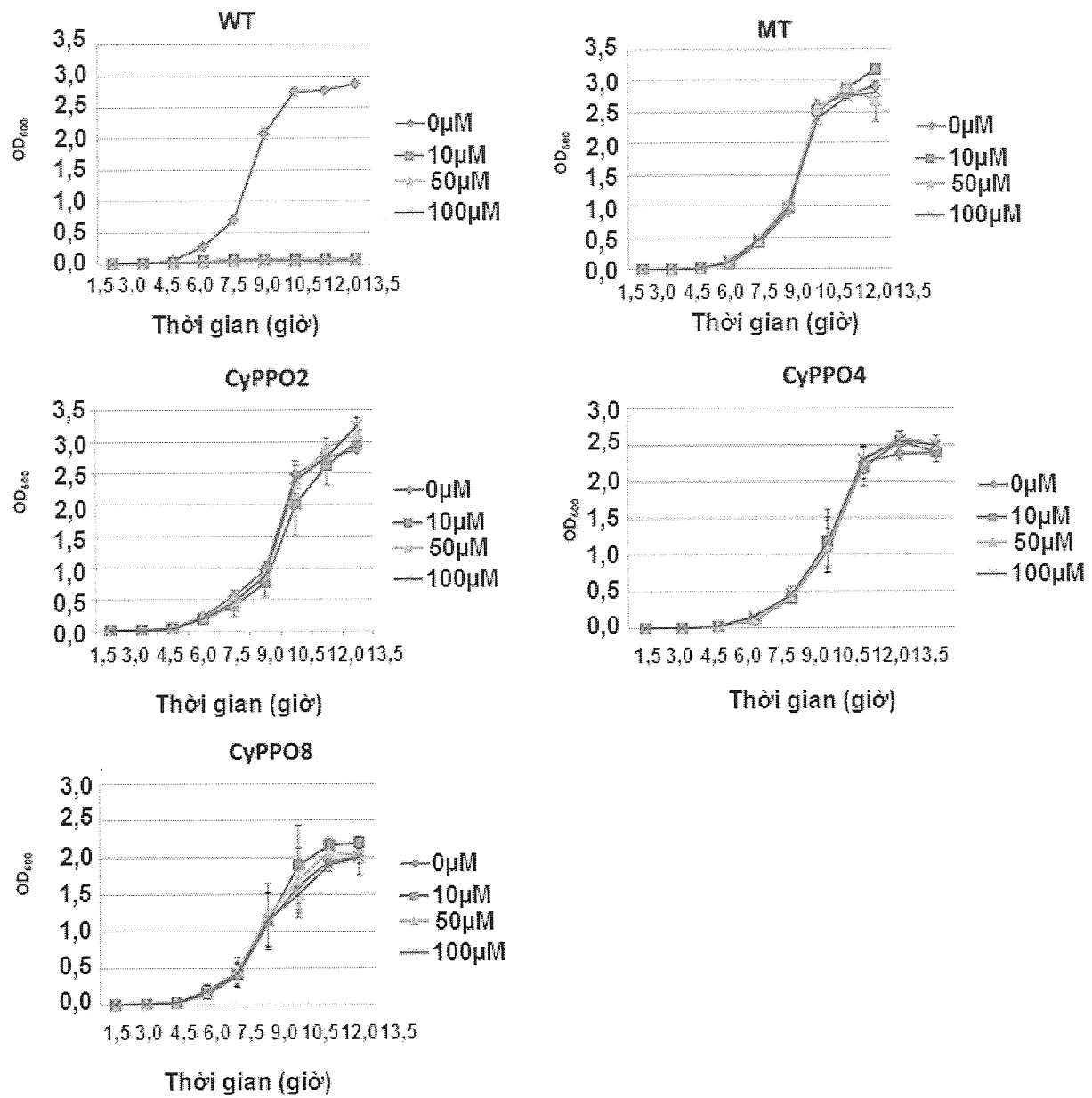


Fig.8

**Fig.9**

**Fig.10**

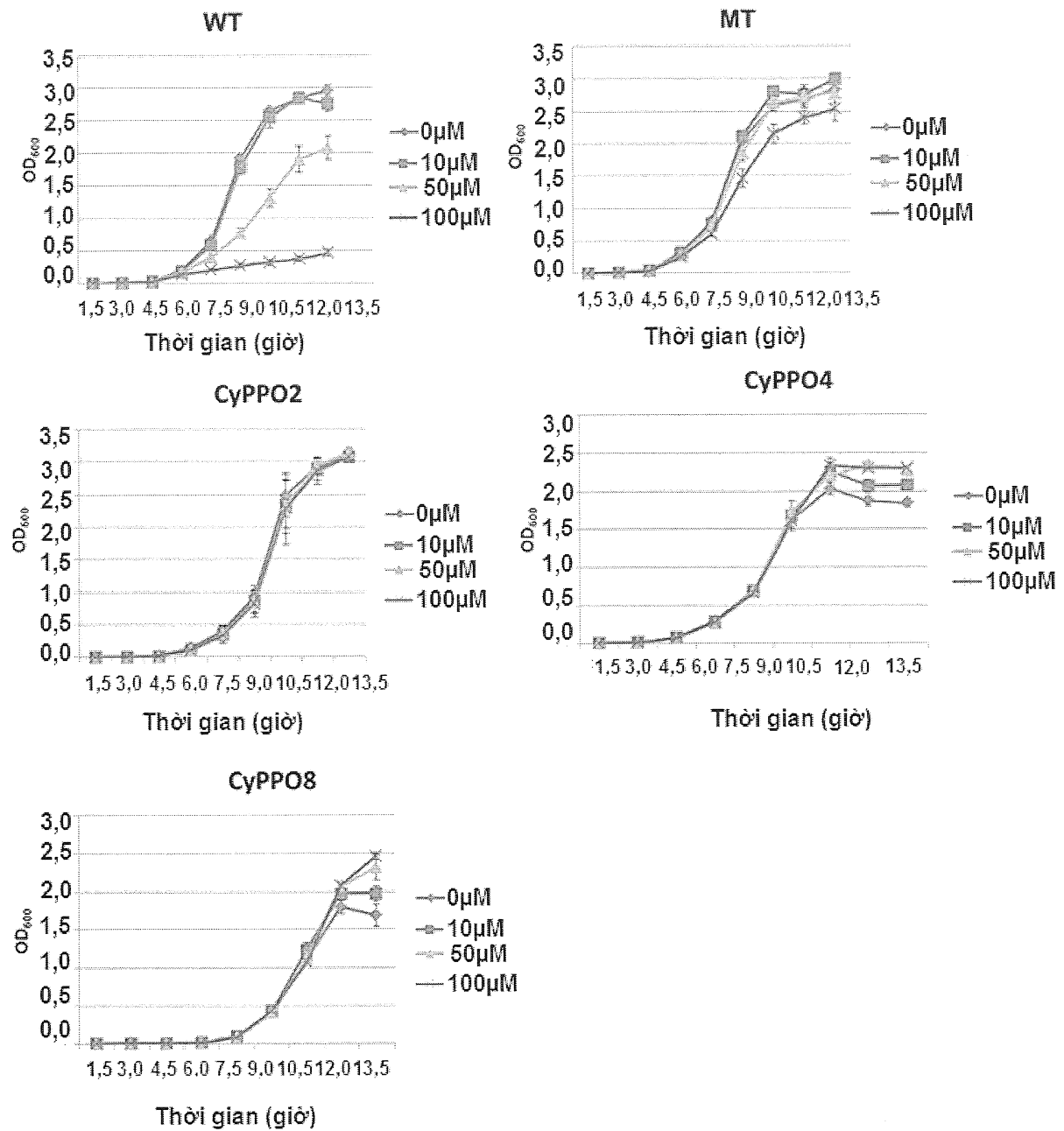


Fig.11

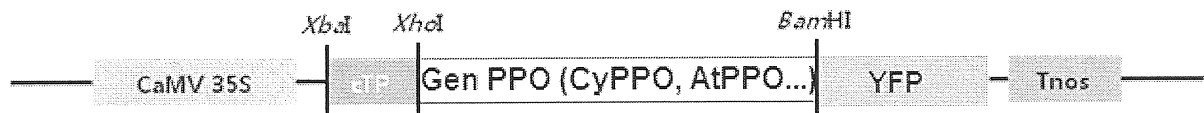


Fig.12

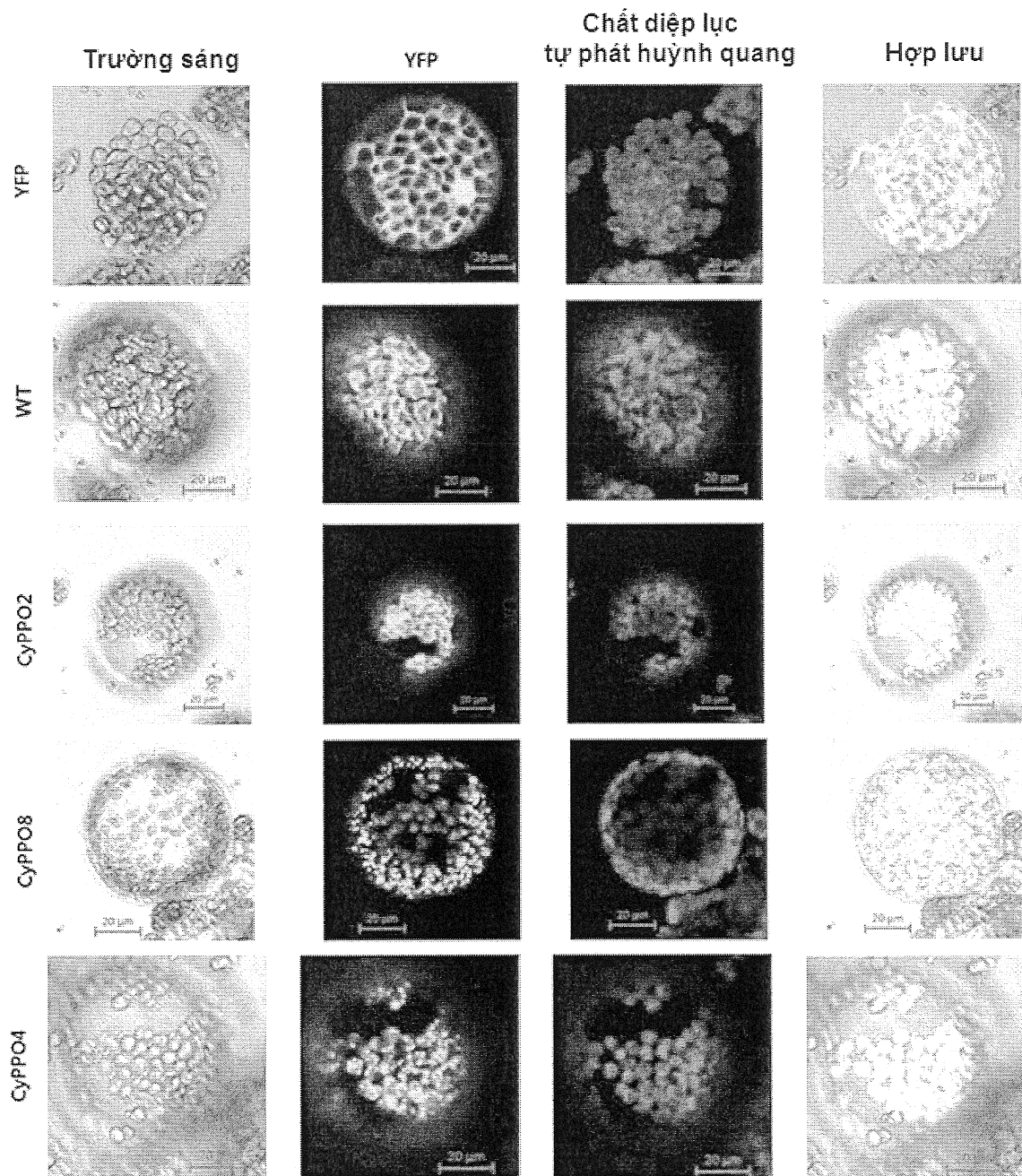
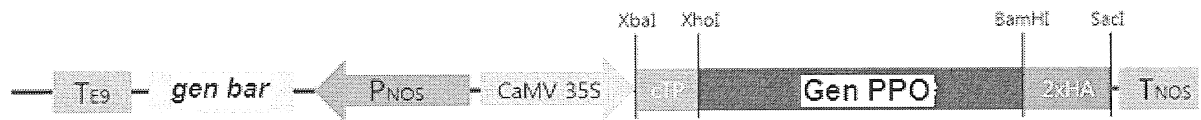
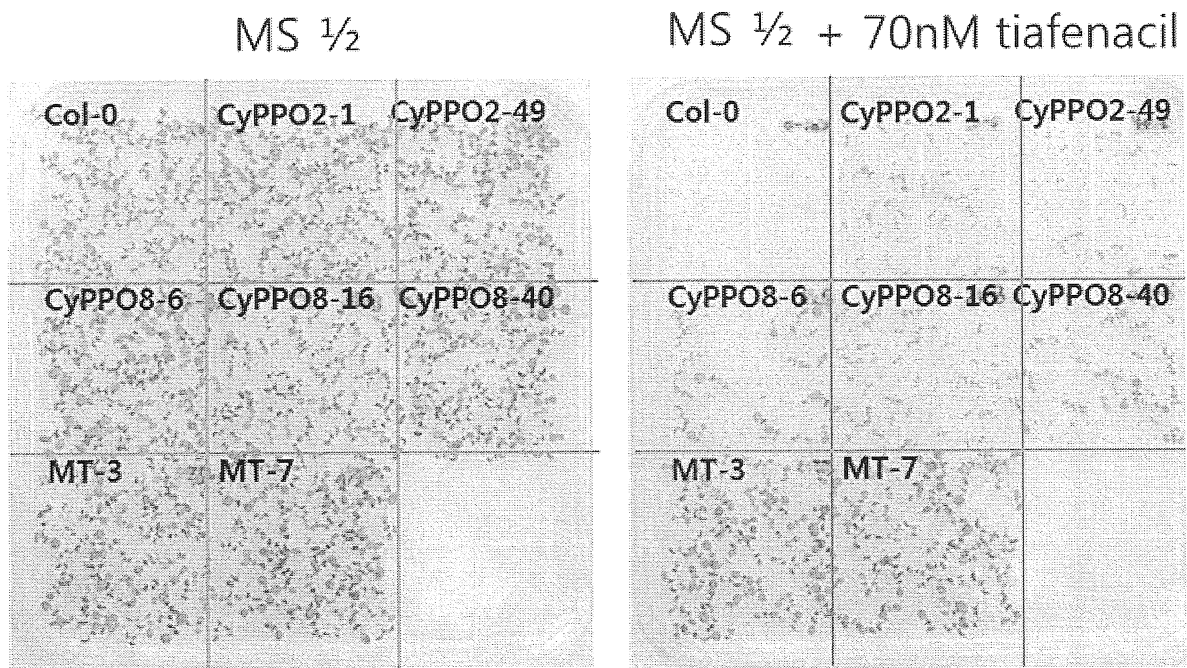
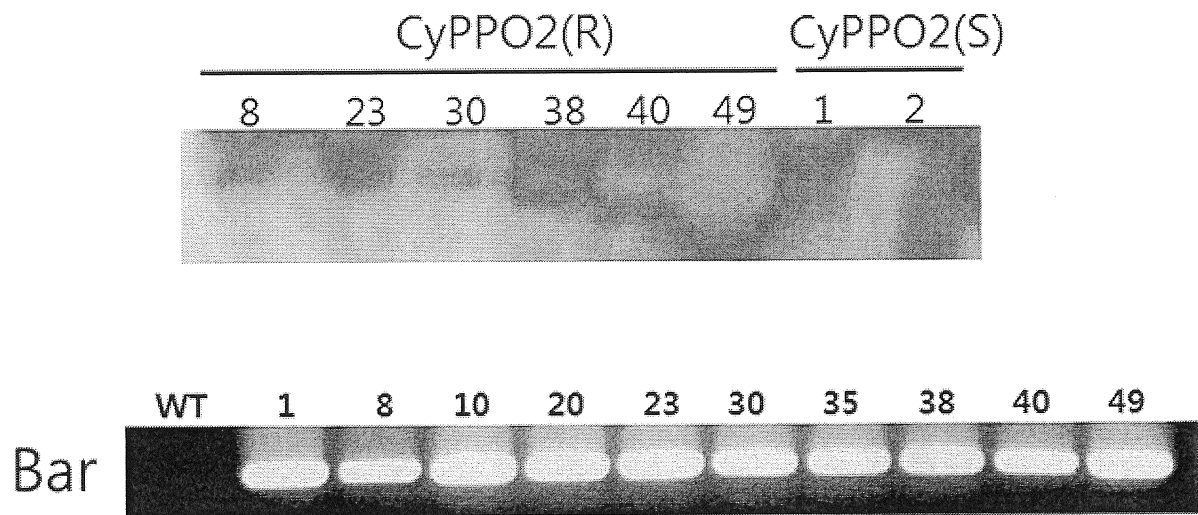
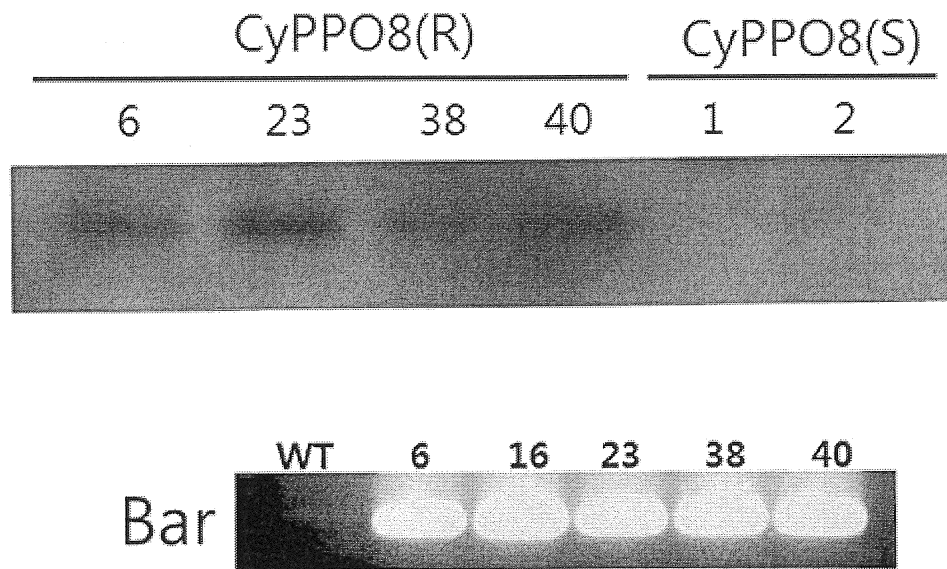


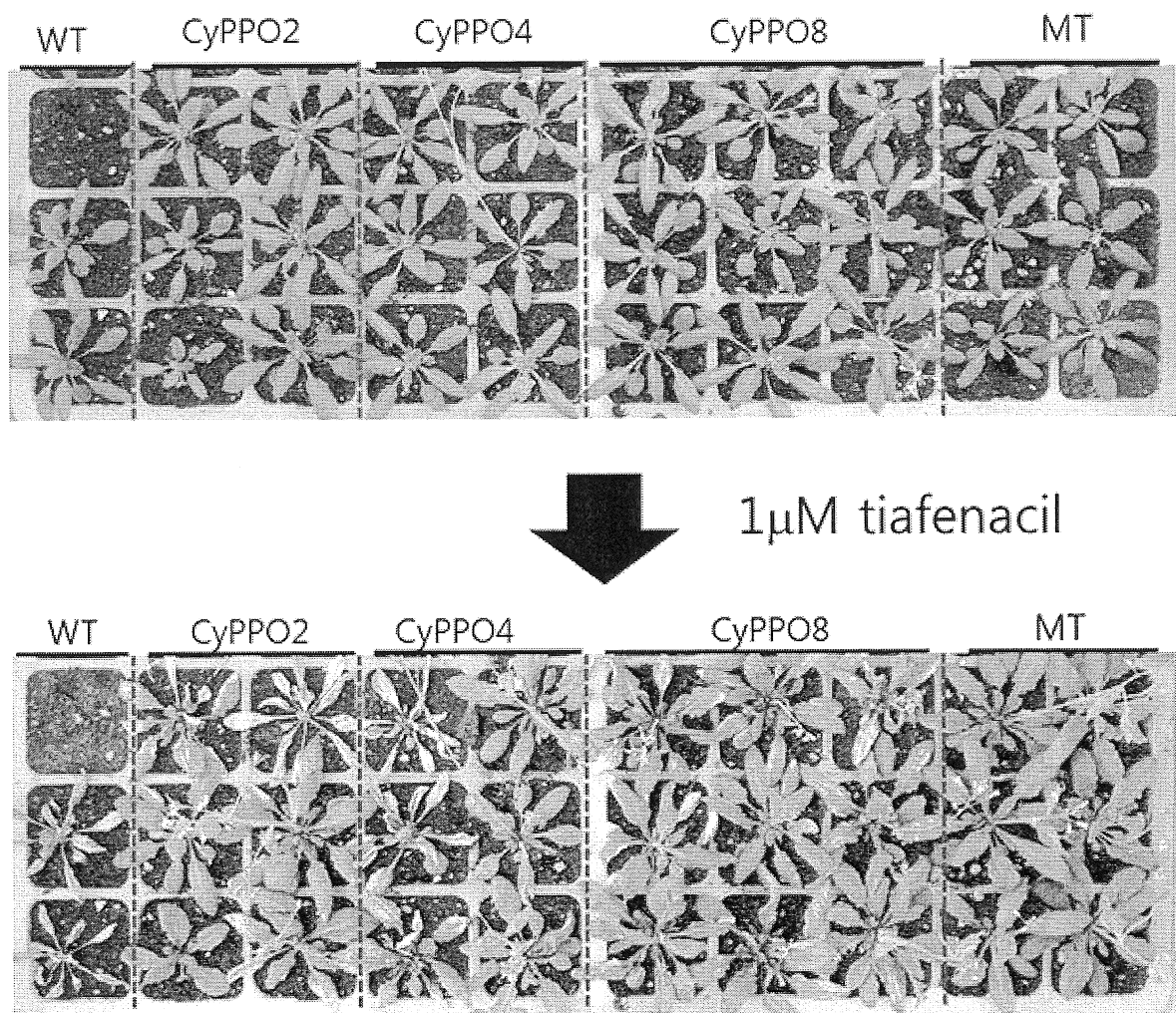
Fig.13

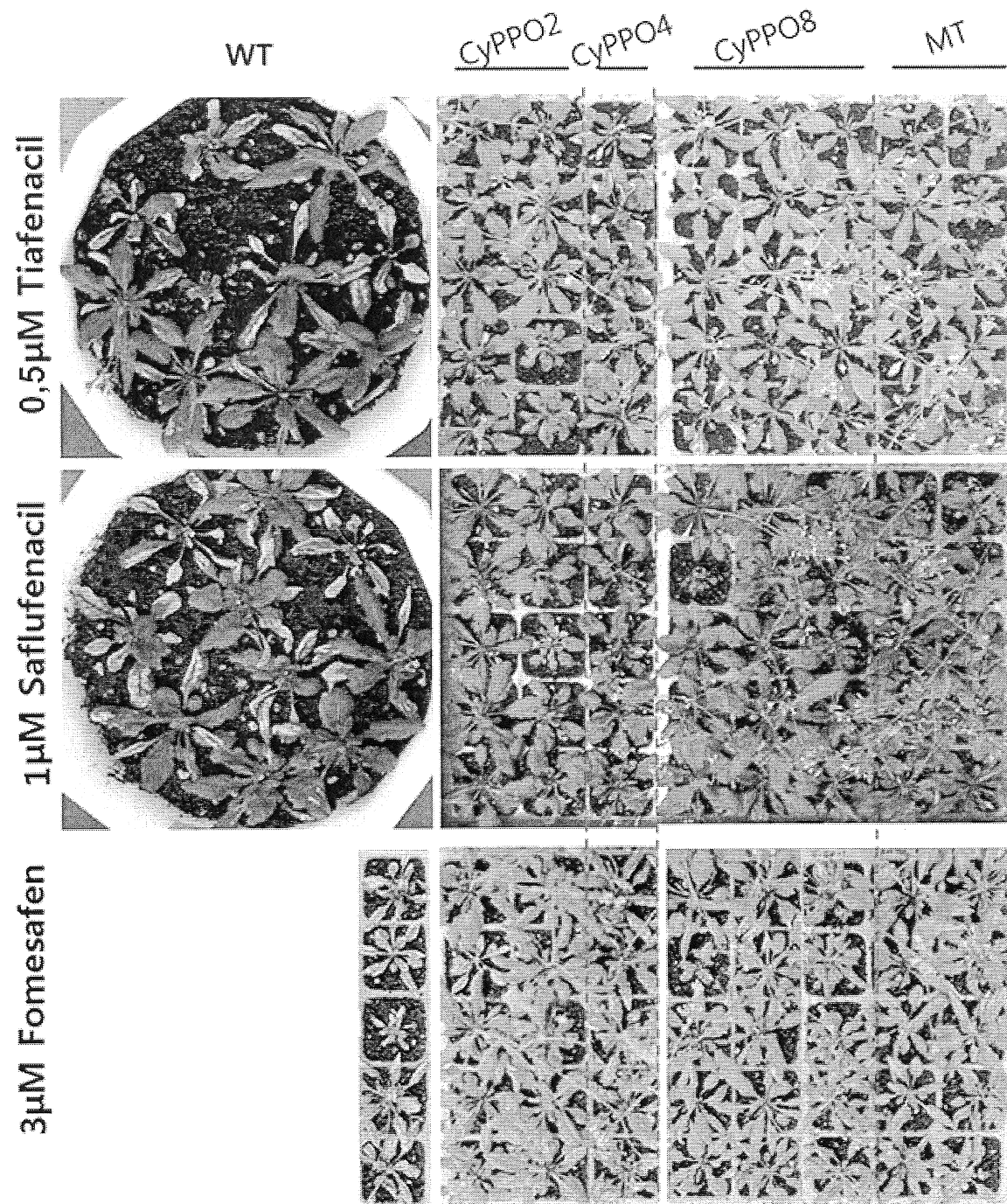
**Fig.14**

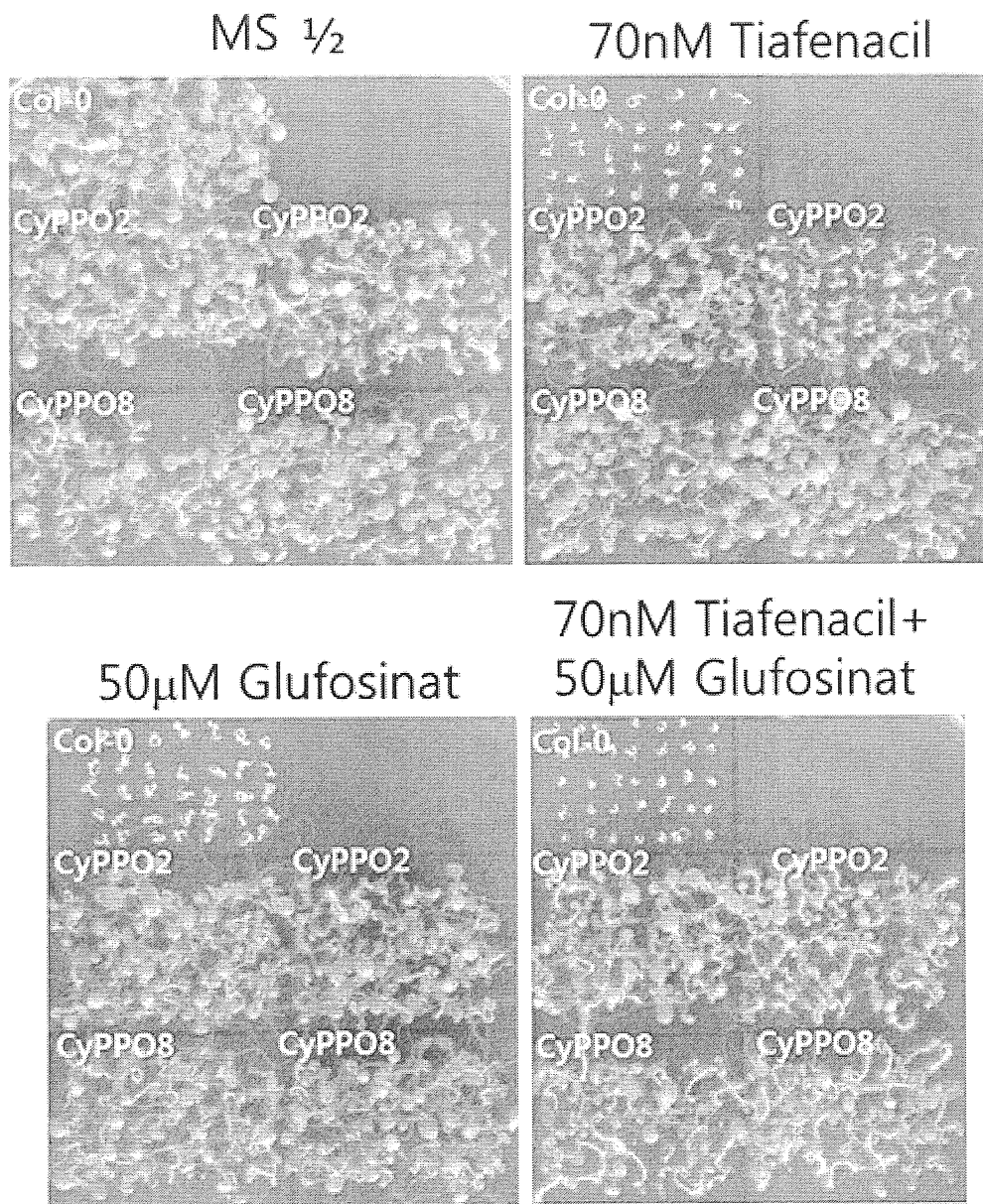
**Fig.15**

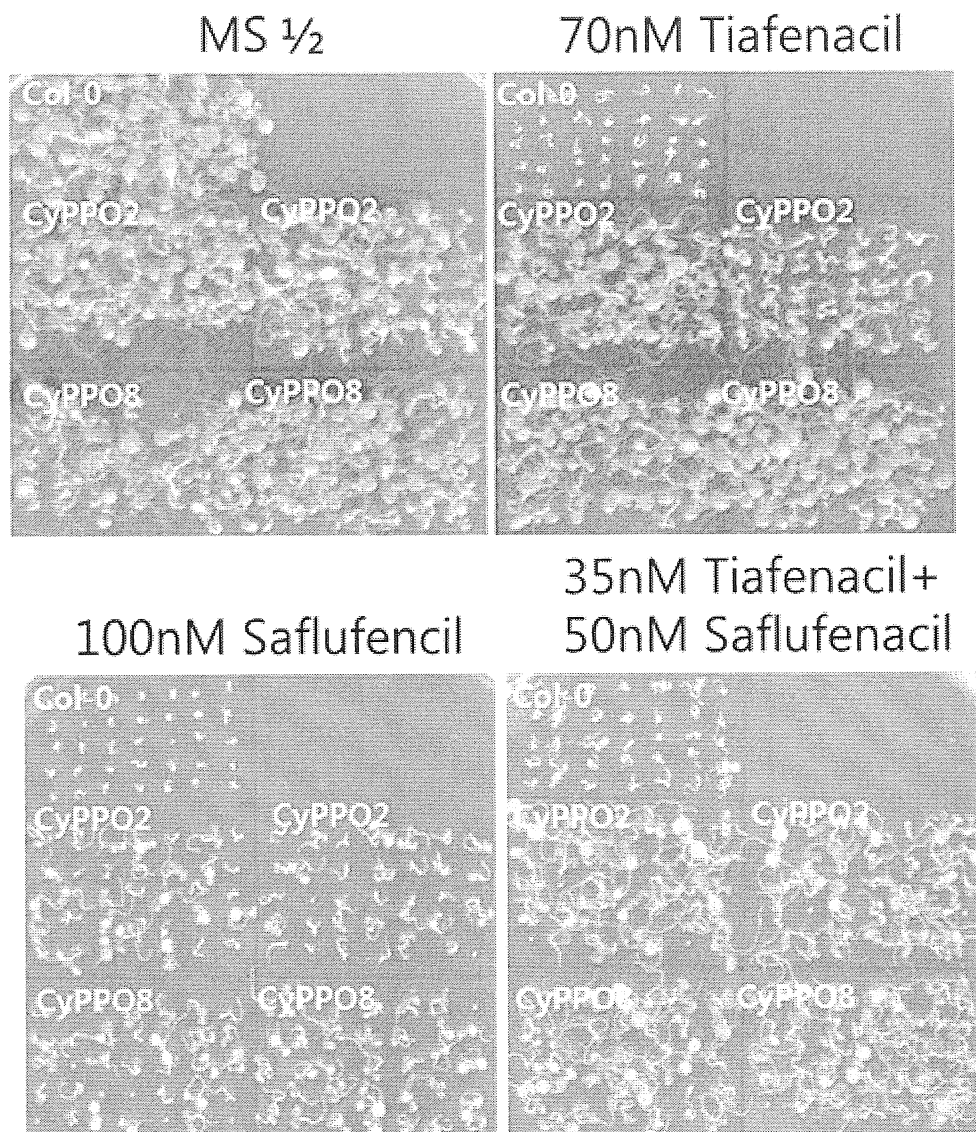
**Fig.16**

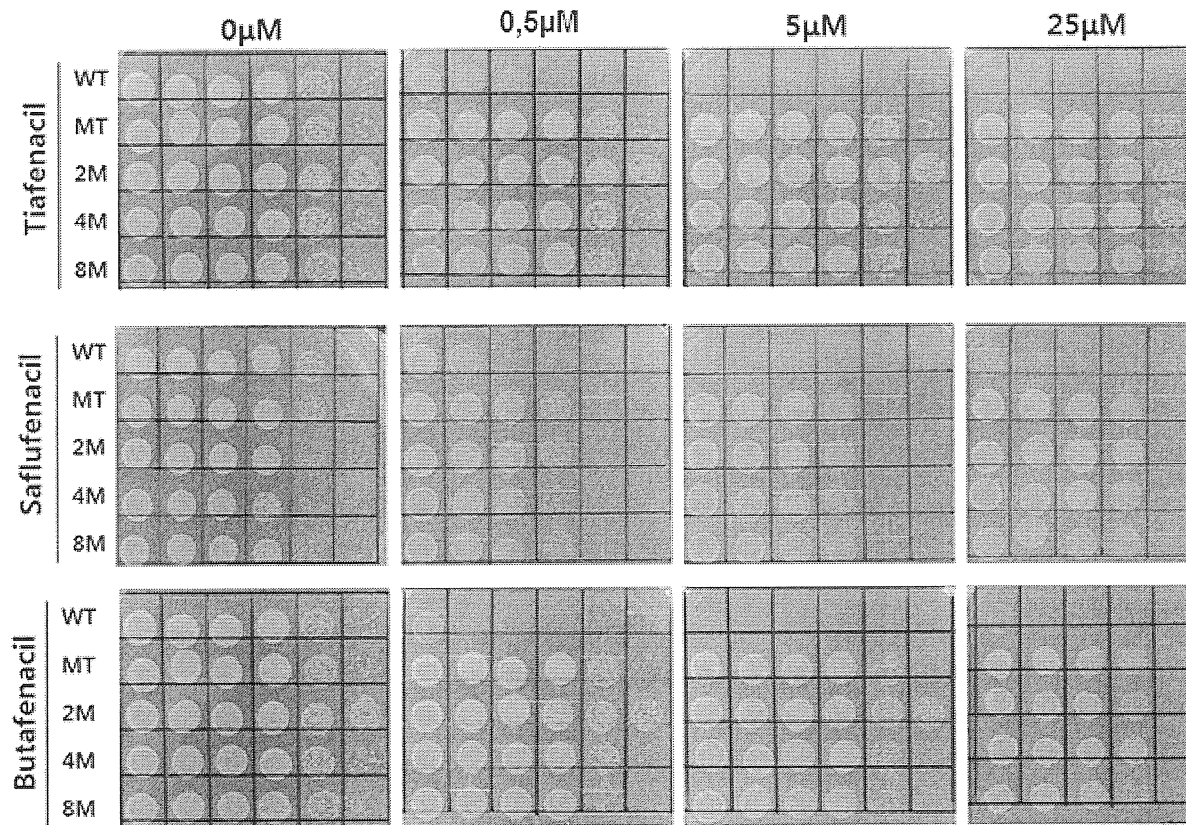
**Fig.17**

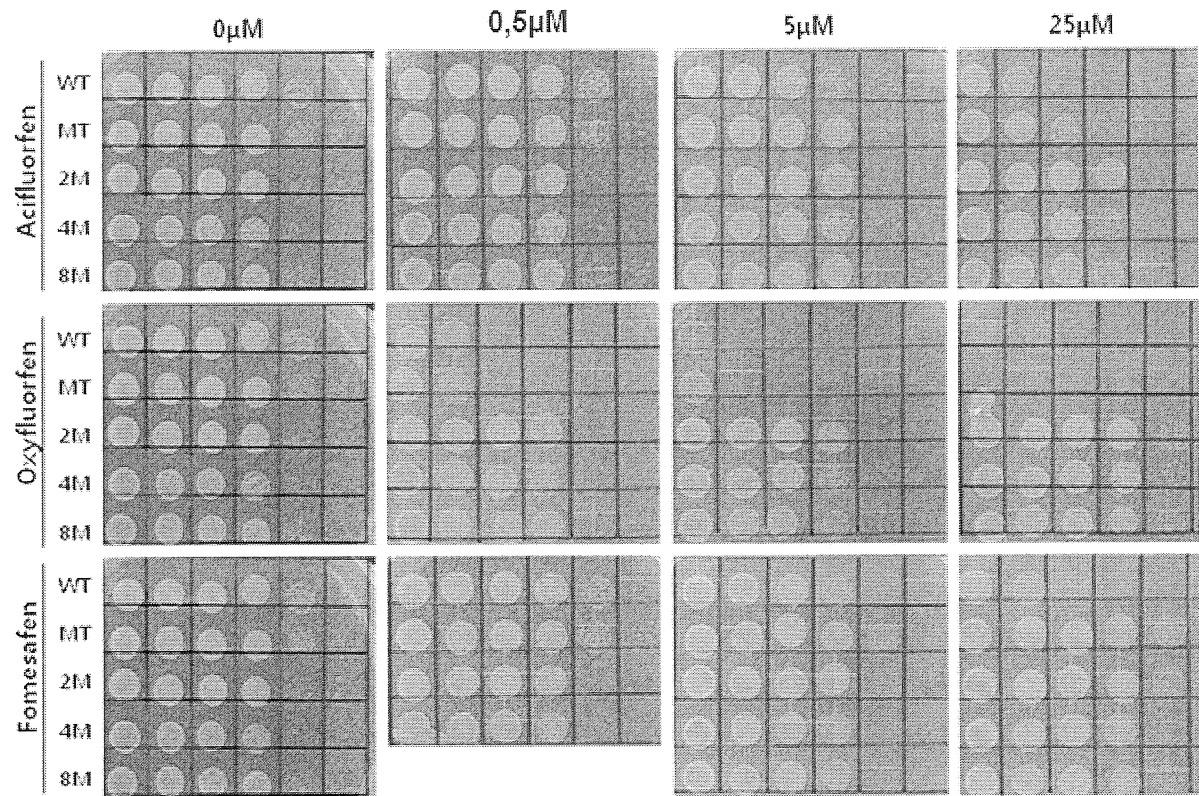
**Fig.18**

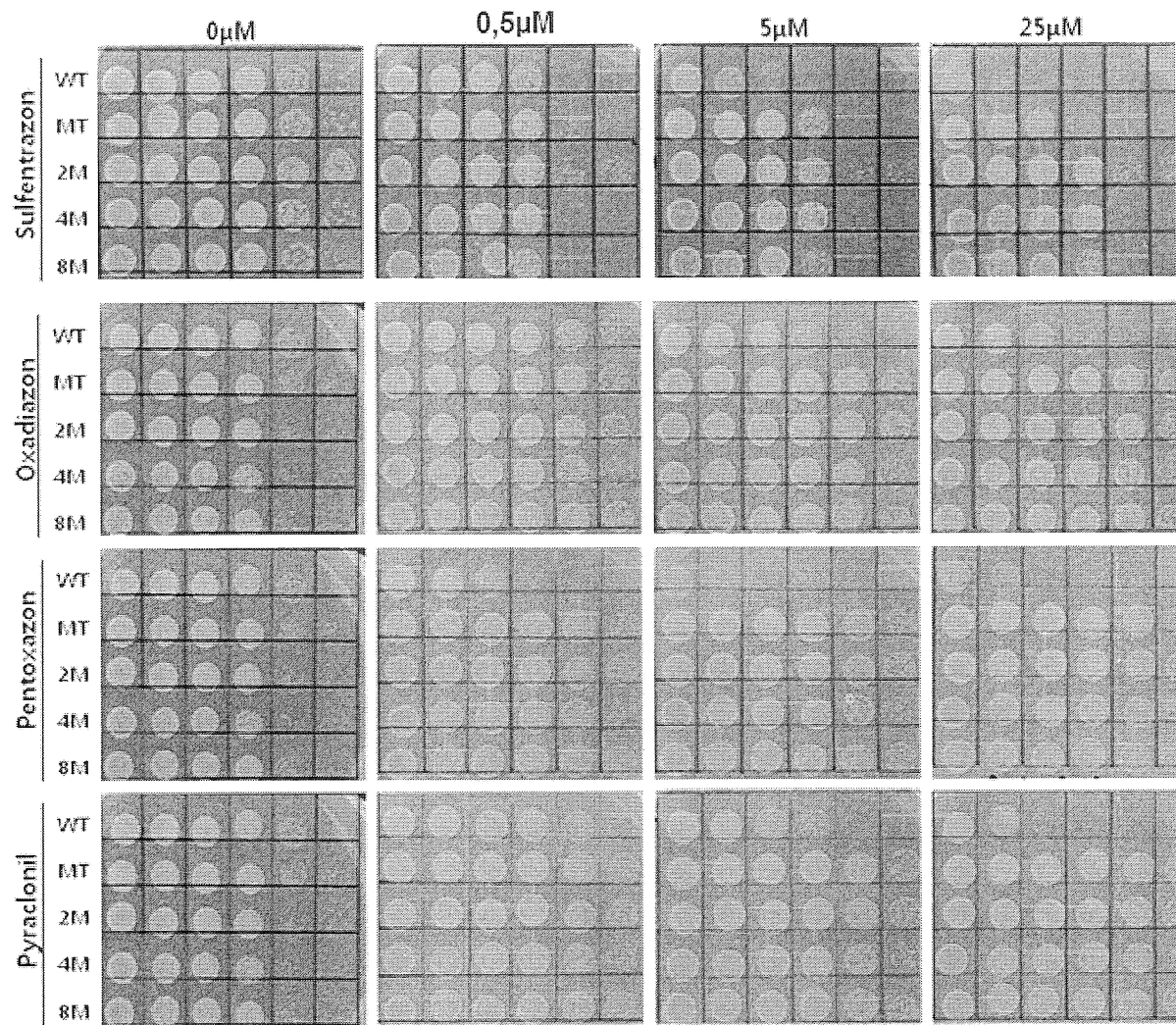
**Fig.19**

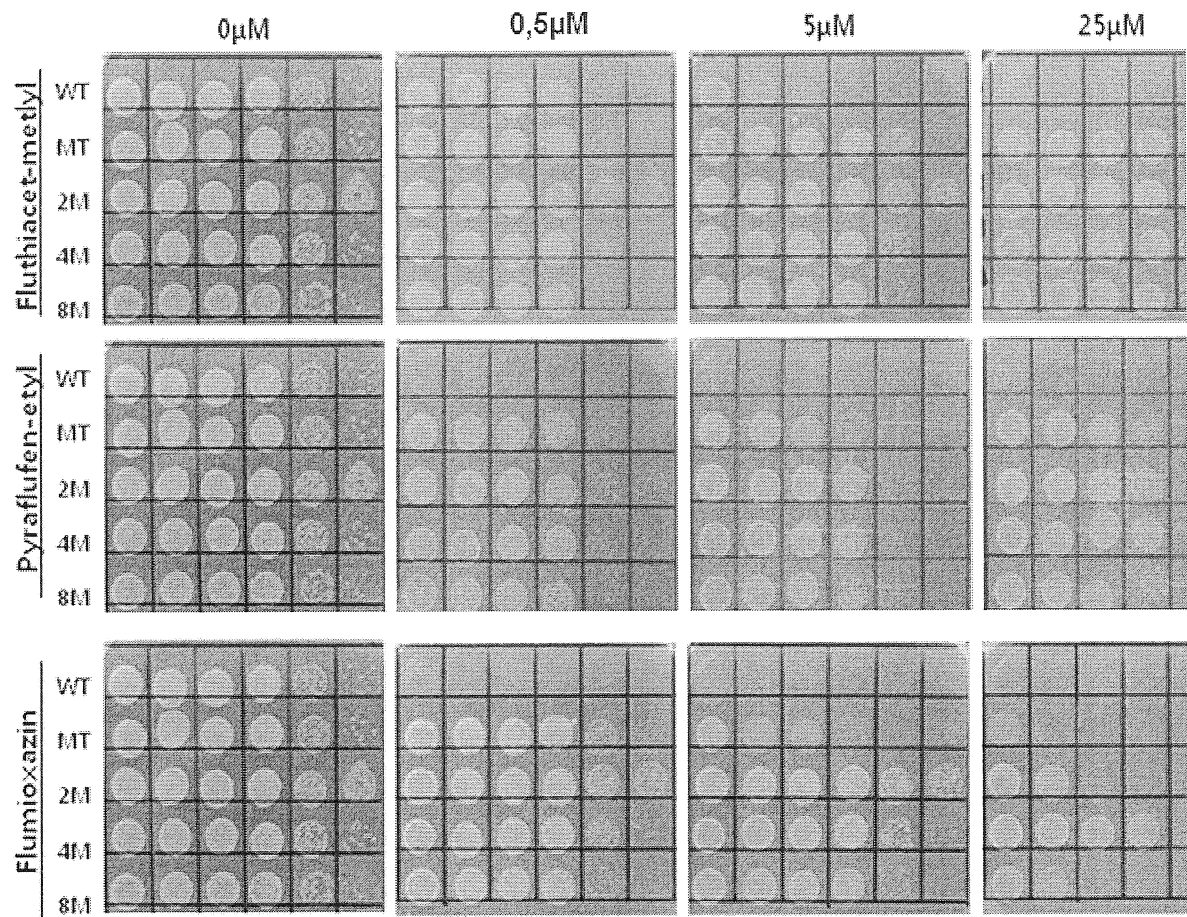
**Fig.20**

**Fig.21**

**Fig.22**

**Fig.23**

**Fig.24**

**Fig.25**

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> FARMHANNONG CO., LTD.
 <120> PHƯƠNG PHÁP TẠO TÍNH KHÁNG CHẤT DIỆT CỎ CHO THỰC VẬT HOẶC TÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT HOẶC TÀO CÓ TÍNH KHÁNG CHẤT DIỆT CỎ
 <150> KR10-2014-0181791
 <151> 2014-12-16
 <160> 34
 <170> KopatentIn 1,71
 <210> 1
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112
 <220>
 <221> Peptit
 <222> (1)..(486)
 <223> CyPPO2
 <400> 1
 Met Glu Leu Leu Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala His Ala Leu His Lys Glu Ala Thr Ser Ala Ser Pro Leu
 20 25 30
 Lys Ile Leu Val Ala Glu Ser Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr
 35 40 45
 Thr Val Thr Ala Glu Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe
 50 55 60
 Ser Pro Thr Pro Glu Leu Met Lys Leu Ala Val Asp Val Gly Leu Lys
 65 70 75 80
 Gln Glu Leu Ile Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Phe Val Tyr Trp
 85 90 95
 Glu Asn Lys Leu Gln Pro Val Pro Met Thr Pro Pro Ala Met Ile Gln
 100 105 110
 Ser Gln Leu Leu Ser Phe Pro Gly Lys Leu Arg Ala Leu Phe Gly Ala
 115 120 125
 Leu Gly Phe Val Ala Pro Ala Met Gly Asp Arg Leu Ser Gln Gln Gly
 130 135 140
 Asn Glu Glu Thr Val Ser Gln Phe Phe Arg Arg His Leu Gly Thr Glu
 145 150 155 160
 Val Met Gln Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala Gly
 165 170 175
 Asp Pro Gln Gln Leu Ser Ala Ala Ala Phe Gly Arg Val Ala Lys
 180 185 190
 Met Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Leu Leu Ser Ala
 195 200 205
 Lys Asn Arg Pro Lys Lys Met Pro Ala Asp Pro Asn Val Pro Lys Thr
 210 215 220
 Lys Pro Gly Glu Leu Gly Ser Phe Lys Gln Gly Leu Lys Ala Leu Pro
 225 230 235 240
 Glu Ala Ile Ala Ala Lys Leu Gly Asp Arg Val Lys Leu Asn Trp His
 245 250 255
 Leu Thr Arg Leu Gln Arg Thr Glu Arg Glu Thr Tyr Ile Ala Glu Phe
 260 265 270
 Ser Thr Pro Asp Gly Gln Gln Glu Val Glu Ala Arg Thr Val Val Leu
 275 280 285
 Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Asp Leu Leu Gln Pro Leu Glu Pro
 290 295 300
 Gln Val Ser Ser Ala Leu Gln Ala Phe Thr Tyr Pro Thr Val Ala Ser
 305 310 315 320
 Val Val Leu Ala Tyr Pro Gln Ser Asp Val Lys Gly Lys Leu Val Gly
 325 330 335
 Phe Gly Asn Leu Ile Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Cys Leu Gly Thr
 340 345 350
 Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ala Gly Trp Gln
 355 360 365
 Thr Leu Thr Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp Ser Glu Ile Gly Asn
 370 375 380
 Leu Asp Ser Glu Gln Ile Val Arg Glu Val His Arg Asp Leu Ser Arg
 385 390 395 400
 Ile Leu Leu Lys Pro Asp Val Pro Gln Pro Lys Val Leu Thr Val Lys
 405 410 415
 Leu Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly His Phe Asp Arg
 420 425 430
 Leu Gln Gln Ile Asp Glu Gly Leu Lys Ser Leu Pro Gly Val Tyr Leu
 435 440 445
 Cys Ser Asn Tyr Val Gly Gly Val Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg Arg
 450 455 460
 Gly Phe Asp Arg Ala Arg Glu Val Gly Glu Tyr Leu Gln Lys Lys Gln
 465 470 475 480
 Ser Asp Thr Arg Ser Ile

485

<210> 2
 <211> 1461
 <212> ADN
 <213> Oscillatoria nigroviridis PCC 7112
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1461)
 <223> CyPPO2
 <400> 2

atggaactat tagatacctt gattgtgggt gcggggtatta gcggtttgag tttggcgcac 60
 gcacttcaca aggaagcaac gactgcatcg ccgctgaaga ttttagtcgc tgagagtcag 120
 ggacgtgttg gcggggaacat cactgactgtg acagcagagg ggtttctctg ggaggagggc 180
 ccgaacagtt tttcgccgac gccggaattg atgaagtgg ctgtggatgt gggattgaag 240
 caggagttag tttttgccga tcgcaaatg cctcgttttg tgtattggga aaataagctg 300
 caaccgggtg cgatgactcc accggcgatg attcagtcct agttgctgag tttccgggg 360
 aaactgcggg cggtgttcggt ggttttgggg ttgtgcgcgc cggaatggg cgatcgactt 420
 tcgcagcagg gtaacgagga aacagtttct caatttttcc gccgtcatct cggtagcgaa 480
 gtgatgcagc ggttggtgga accttttgtt tctggggttt atgccggcga tccgcaacaa 540
 cttagcgcg cgcgcgcttt tggccgggta gccaaagatg ctgatgtggg tggcgggctg 600
 gtgcggggg cgctgctttc tgctaaaaac agaccgaaga aaatgcctgc agaccggaat 660
 gttcctaaaa ctaagccggg ggagtgggt tcgttcaagc aggggttgaa ggctttgcca 720
 gagcgatcg ctgctaagtt gggcgatcga gtgaaactca actggcactt gactcgctc 780
 cagcgcacag aacgcgaaac ttacattgct gaattctcga cgcccgacgg acagcaggaa 840
 gttgagcgcg gcacgggtgt ttgacaacg ccgcttacg ttacagccga tttgttgcaa 900
 cctctggaac cgcaagttag cagcgcttta caagctttta cttatcctac ggttgctcctc 960
 gttgtcttag catacccgca gtcggatgtc aagggtaaat tagtgggttt tggaaattta 1020
 attccgaggg ggcagggatg tcgctgtctc gggacgattt ggacatcgag tttatttccc 1080
 gatcgcgcg cgctcaggtg gcaaaactctc accagttaca tcggcggggc aacagactcg 1140
 gaaattggca atctcgactc agaacaaatc gttcggggagg tacaccgaga tttgtctcgg 1200
 atttgtctga aaccagatgt gccacagcca aaagttttaa cgggtgaagct gtggaacgg 1260
 gcgattcctc agtacaattt ggggcatttc gatcgctcgc aacaaatcga tgagggctta 1320
 aaatctttgc ctggagtgta tttgtgcagc aactacgttg gcggagtggc tttgggagat 1380
 tgcgtgcgaa ggggtttcga tcgtgcgcga gaagtgggcg agtatttgca gaagaacaa 1440
 tcagatactc gatgatctg a 1461

<210> 3
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> Lyngbya sp. PCC 8106
 <220>
 <221> Peptit
 <222> (1)..(479)
 <223> CyPPO4
 <400> 3

Met Thr His Val Leu Asp Ser Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ala His Ala Leu His Gln Asn Gln Asp His Gln Leu Pro
 20 25 30
 Leu Asn Ile Leu Val Ser Glu His Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile
 35 40 45
 Thr Thr Val Ser Glu Gly Glu Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser
 50 55 60
 Phe Ser Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Leu Ala Val Glu Val Gly Leu
 65 70 75 80
 Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Tyr Val Tyr
 85 90 95
 Trp Asn Gly Gln Leu Met Pro Val Pro Met Ser Pro Pro Ala Leu Leu
 100 105 110
 Ser Thr Lys Leu Leu Ser Pro Gly Gly Lys Leu Arg Ala Leu Thr Gly
 115 120 125
 Ala Leu Gly Phe Val Gln Pro Ala Met Gly Glu Ser Leu Ser Gln Gln
 130 135 140
 Asn Gly Glu Glu Thr Ile Ser Gln Phe Phe Glu Arg His Leu Gly Ser
 145 150 155 160

Glu Val Leu Lys Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala
 165 170 175
 Gly Asp Pro Gln Gln Leu Glu Ile Ser Ser Ala Phe Ala Arg Val Ala
 180 185 190
 Arg Met Ala Tyr Ser Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Val Leu Ser
 195 200 205
 Arg Arg Gln Asn Lys Ser Pro Arg Ser Pro Ala Asp Pro Ser Ile Pro
 210 215 220
 Gln Thr Lys Arg Gly Glu Leu Gly Ser Phe Arg Gln Gly Ile Gly Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro Asn Ala Ile Ala Lys Gln Leu Gly Asp Gln Leu Lys Leu Asn
 245 250 255
 Trp Gln Leu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Glu Asn Gln Thr Tyr Arg Ala
 260 265 270
 Glu Phe Ser Thr Pro Glu Gly Val Gln Gln Val Glu Thr Arg Thr Val

```

      275              280              285
Val Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Glu Ile Leu Lys Pro Leu
      290              295              300
Gln Leu Gln Val Ser Gln Thr Leu Thr Glu Ile Pro Tyr Pro Pro Val
      305              310              315              320
Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Val Ser Ala Leu Lys Gln Lys Leu
      325              330              335
Thr Gly Phe Gly Asn Leu Val Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Thr Leu
      340              345              350
Gly Thr Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Gln Gly
      355              360              365
Trp Gln Val Leu Thr Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp Pro Glu Ile
      370              375              380
Gly Glu Leu Glu Asp Asp Gln Ile Val Glu Ala Val His Gln Asp Leu
      385              390              395              400
Arg His Ile Leu Leu Lys Glu Asp Ile Ser Pro Lys Val Leu Ala Val
      405              410              415
His Leu Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly His Gln Gln
      420              425              430
Arg Leu Gln His Val Asn Glu Gly Leu Glu Ala Met Pro Gly Leu Tyr
      435              440              445
Leu Cys Ser Asn Tyr Ile Asp Gly Val Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg
      450              455              460
Arg Ser Ile Gly Gln Ala Asn Glu Ile Leu Ser Phe Leu Gly Gln
      465              470              475
<210>      4
<211>      1440
<212>      ADN
<213>      Lyngbya sp. PCC 8106
<220>
<221>      gen
<222>      (1)..(1440)
<223>      CyPPO4
<400>      4
atgactcacg tactcgatag tttaatcgtc ggtgcaggca ttagcggcct ggcgttagct      60
catgctctcc atcagaacca agatcatcaa ttgcctctca acattcttgt cagcgagcat      120
caaggacggg taggagggaaa tataaccaca gtatccgaag gagaatttct ttgggaagaa      180
ggccccaata gtttttctcc aacccctgag ttactgaagt tagcggtaga agtaggtctt      240
aagcctgagc tagtctttgc cgatcgcaag ttacctcggg acgtttactg gaatgggtcaa      300
ctcatgcctg tgccgatgag tcctccggct ttgttgagta caaaactctt aagtcctgga      360
ggtaaaacttc gagcattaac gggggcattg gggtttgtac aaccgcgat gggagaatcg      420
ttaagtcaac aaaatgggga agaaacgata tcgcagtttt ttgagcgtca tttgggttca      480
gaagtcttca agcgactggt tgaacccttt gtttctggtg tttatgcagg cgatccccag      540
caactcgaaa ttagctcggc ttttgcccga gtcgcacgta tggcttacag tggcgggtgga      600
ttggttgctg gagcgggttt atcgcgtcgt cagaacaaat ctccgcgat gcctgccgac      660
ccgtctattc cccaaactaa acggggagag ttgggggtct ttcgtcaggg gattggagcc      720
ttaccaaatg cgatcgccaa acagtttagc gatcaactca aattaaactg gcaactcacc      780
cgtctcgaac ggactgaaaa ccaaaccctat cgggctgaat ttctgactcc agaagggggt      840
caacaggtag aaactcgaa ggtggtgttg acgactccgg cctatgtcac agcagaaatt      900
ctcaaaccgt tgcaactcca agtcagtcaa acgttaactg aaattcccta tccccgggtg      960
gcttgcgctg ttttagccta tcccgtttca gctttaaagc agaaattaac cggatttggc      1020
aatttagttc cccgaggaca agggattcgg acgttaggca cgatttggac atcgagtta      1080
tttcttggtc gcgccccca aggctggcaa gtcctcacca gttatattgg cggagcgacg      1140
gatctagaaa ttggagagtt agaagatgat caaattgttg aggcggttca tcaagatttg      1200
cgtcacattt tactcaaaga agatatctct cccaaagtgc tagcgtgca tctgtggaaa      1260
cgtgctatcc ctcaatacaa tctcggacac caacaacggt tacaacacgt taatgagggt      1320
ctagaggcaa tgccgggggt atatctgtgt agcaactata tcgacgggtg agcgttggga      1380
gattgtgtgc gtcgttctat cggacaagct aacgaaattc tcagtttttt gggtaaatag      1440
<210>      5
<211>      466
<212>      PRT
<213>      Halotheca sp. PCC 7418
<220>
<221>      Peptit
<222>      (1)..(466)
<223>      CyPPO8
<400>      5
Met Ile Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Ser Ala
      1              5              10              15
Ala Tyr Arg Leu Asp Glu Lys Gln Arg Gln Val Leu Val Ala Glu Lys
      20              25              30
Arg Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Ser Gln Gln Ser Gly Asp Phe
      35              40              45
Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Ser Pro Thr Pro Glu Leu Leu
      50              55              60
Lys Leu Ala Val Asp Ala Gly Leu Arg Asn Glu Leu Ile Phe Ala Asp
      65              70              75              80
Arg Gly Leu Pro Arg Tyr Val Tyr Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val
      85              90              95
Pro Met Ser Pro Pro Thr Ala Val Thr Ser Gln Leu Leu Ser Pro Ile

```

```

      100              105              110
Gly Lys Leu Arg Ala Leu Thr Gly Ala Leu Gly Phe Ile Pro Pro Gln
      115              120              125
Val Ser Ser Gln Glu Glu Thr Val Ala Asp Phe Phe Thr Arg His Leu
      130              135              140
Gly Ser Glu Val Ala Gln Arg Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Gly Val
      145              150              155              160
Tyr Ala Gly Asp Val Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ala Ala Phe Gly Arg
      165              170              175
Val Thr Gln Leu Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Ile
      180              185              190
Leu Cys Arg Arg Gln Lys Pro Lys Ser Thr Pro Lys Thr Ala Lys Pro
      195              200              205
Ser Asp Ile Pro Glu Thr Lys Ser Gly Gln Leu Gly Ser Phe Lys Glu
      210              215              220
Gly Leu Gln Gln Leu Pro Ser Ala Ile Val Ser Gln Leu Gly Asp Lys
      225              230              235              240
Val Lys Phe Gln Trp Glu Leu Lys Asn Ile Ser Pro His Pro Glu Ser
      245              250              255
Gly Tyr Val Ala Thr Phe Ser Thr Pro Glu Gly Glu Gln Thr Val Glu
      260              265              270
Ala Lys Thr Val Ile Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Ser Leu
      275              280              285
Val Lys Asp Leu Ser Pro Gln Ala Ser Gln Ala Leu Asn Glu Ile Ser
      290              295              300
Tyr Pro Pro Val Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Asp Glu Ala Leu
      305              310              315              320
Arg Phe Pro Leu Lys Gly Phe Gly Asn Leu Asn Pro Arg Ser Gln Gly
      325              330              335
Ile Arg Thr Leu Gly Thr Ile Trp Ser Ser Thr Leu Phe Pro Gly Arg
      340              345              350
Thr Pro Lys Gly Trp His Leu Thr Asn Phe Ile Gly Gly Ala Thr
      355              360              365
Asp Pro Ala Ile Ala Glu Leu Ser Glu Asp Gln Ile Ile Glu Gln Val
      370              375              380
His Gln Asp Leu Gln Gln Ala Val Ile Lys Ser Gly Ser Ile Pro Lys
      385              390              395              400
Pro Leu Ala Val His Leu Trp Ser Lys Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu
      405              410              415
Gly His Leu Lys Arg Leu Glu Thr Ile Arg Asn His Leu Lys Pro Phe
      420              425              430
Ser Gly Leu Phe Leu Ser Ser Asn Tyr Leu Asp Gly Val Ala Leu Gly
      435              440              445
Asp Cys Val Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Gln Ala Val Leu Asp Tyr
      450              455              460
Leu Gly
465
<210>      6
<211>      1401
<212>      ADN
<213>      Halotheca sp. PCC 7418
<220>
<221>      gen
<222>      (1)..(1401)
<223>      CyPPO8
<400>      6
atgatagata ctttaattgt gggagcaggg attagtgggt taagtgctgc gtatcgactc      60
gatgagaagc agcgccaagt gctggttgca gaaaagcgcg atcgcgctgg gggaaatatac      120
accagccaac aaagtggcga ttctctctgg gaagaaggac cgaacagttt ttctcccaca      180
ccagaactcc taaaactagc ggttgatgcg ggcttaagaa atgagttaat ctttgctgat      240
cgcggaactc cccgttatgt ttattgggag gggaaactgc gccctgttcc tatgagtccc      300
cccacagccg tgacatccca gttgctgagt ccaatcggga aactacgggc gttaacgggt      360
gcattaggct ttattccccc gcaagtgtcg agtcaggaag aaacggttgc ggactttttt      420
acccgtcatc tcggttcaga agtagcccaa cggttagtga gtccgtttgt gtctgggggt      480
tatgcagggg atgtggatca actcagtgcg gaagctgcat ttggacgagt tacccaactg      540
gcggatgtgt gcggtggact ggtcgaggt gcgattttat gtcgtcgtca aaagccaaag      600
tcaaccccaa aaacgggctaa accgtctgat attccagaaa caaagtctgg acagttaggt      660
tcatttaagg aaggattaca acaattaccc agcgcgatcg ttctcaact gggagacaaa      720
gtaaagtttc aatgggaact gaaaaatata tcccccatc cagaatcggg ttacgtcgcg      780
acattttcca caccagagg agaacaaaaca gtcgaaagcca aaaccgttat cctcaccact      840
ccgcctacg ttaccgcctc tctggtcaaa gatattcac ctcaagccag tcaagccctta      900
aacgaaatct cctatcccc cgtagcttgt gtggtcttag cctatcccga tgaagccctc      960
cgttttcccc tcaaaggatt tggtaatctt aaccctcgca gtcaaggaat ccgcaactctt      1020
ggtaacaatt ggagttcaac actctttcca ggacgcacgc cgaaagggtg gcatctctta      1080
accaatttta ttggcgggtc aactgatccc gcaattgctg aactcagtga agatcaaatt      1140
attgaacaag tccatcaaga cttacaacaa gcggtgatta aatcggaag tatcccgaaa      1200
cccttagccg ttcatattgt gtcaaaagcg attccgcaat acaatctcgg acatctgaaa      1260
cgggttagaaa ccatccgcaa tcacttaaaa cccttctctg gactcttttt atcgagtaac      1320
tatctcgatg gcgttgctgt ggtgattgt gtgcgccgag gggaagagag tagtcaagcc      1380
gtgtagattt atttgggtta a
1401

```

```

<210>      7
<211>      486
<212>      PRT
<213>      Microcoleus vaginatus
<220>
<221>      Peptit
<222>      (1)..(486)
<223>      CyPPO12
<400>      7
Met Glu Leu Leu Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu
 1          5          10          15
Ser Leu Ala His Ala Leu His Lys Glu Ala Thr Ser Pro Ser Ser Leu
          20          25          30
Lys Ile Leu Val Ala Glu Ser Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr
          35          40          45
Thr Val Thr Ala Glu Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe
          50          55          60
Ser Pro Thr Pro Glu Leu Met Lys Leu Ala Val Asp Val Gly Leu Lys
          65          70          75          80
Gln Glu Leu Ile Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Phe Val Tyr Trp
          85          90          95
Gln Asn Lys Leu Gln Pro Val Pro Met Thr Pro Pro Ala Met Ile Gln
          100          105          110
Ser Gln Leu Leu Ser Phe Pro Gly Lys Leu Arg Ala Leu Phe Gly Ala
          115          120          125
Leu Gly Phe Val Ala Pro Ala Ile Gly Ser Gly Leu Ser Gln Gln Gly
          130          135          140
Asp Glu Glu Thr Val Ser Gln Phe Phe Arg Arg His Leu Gly Thr Glu
          145          150          155          160
Val Met Gln Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala Gly
          165          170          175
Asp Pro Gln Gln Leu Ser Ala Ala Ala Ala Phe Gly Arg Val Thr Lys
          180          185          190
Met Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Met Ala Gly Ala Leu Leu Ser Ala
          195          200          205
Arg Lys Arg Pro Lys Gln Met Pro Ala Asp Pro Asn Val Pro Ser Thr
          210          215          220
Arg Pro Gly Glu Leu Gly Ser Phe Lys Gln Gly Leu Lys Ala Leu Pro
          225          230          235          240
Glu Ala Ile Ala Ala Gln Leu Gly Asp Arg Val Lys Val Asn Trp His
          245          250          255
Leu Thr Arg Leu Gln Arg Thr Glu Arg Glu Thr Tyr Ile Ala Val Phe
          260          265          270
Ser Thr Pro Asp Gly Gln Gln Glu Val Glu Ala Arg Thr Val Val Leu
          275          280          285
Thr Thr Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Glu Leu Leu Gln Pro Leu Gln Pro
          290          295          300
Lys Val Ser Ser Ala Leu Gln Ala Phe Thr Tyr Pro Thr Val Ala Cys
          305          310          315          320
Val Val Leu Ala Tyr Pro Gln Ser Asp Val Lys Asp Lys Leu Val Gly
          325          330          335
Phe Gly Asn Leu Ile Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Thr Leu Gly Thr
          340          345          350
Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Ala Asp Arg Ala Pro Ala Gly Trp Gln
          355          360          365
Thr Leu Ser Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp Ser Glu Ile Gly Asn
          370          375          380
Leu Asp Ser Glu Gln Ile Val Arg Glu Val His Arg Asp Leu Ser Arg
          385          390          395          400
Ile Leu Leu Lys Pro Asp Val Pro Gln Pro Lys Val Leu Ala Val Asn
          405          410          415
Val Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly His Phe Asp Arg
          420          425          430
Leu Gln Gln Ile Asp Glu Gly Leu Lys Ser Leu Pro Gly Val Tyr Leu
          435          440          445
Cys Ser Asn Tyr Val Gly Gly Val Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg Arg
          450          455          460
Gly Phe Glu Arg Ala Arg Glu Val Gly Glu Tyr Leu Gln Asn Lys Gln
          465          470          475          480
Ser Asp Thr Arg Ser Ile
          485

<210>      8
<211>      1461
<212>      ADN
<213>      Microcoleus vaginatus
<220>
<221>      gen
<222>      (1)..(1461)
<223>      CyPPO12

```

```

<400>      8
atggaactct tggatactct cattgttggg gcagggtattt caggactttc tctcgcacac      60
gctttacata aggaggctac ttcacatctc tcacttaaga ttttggttgc tgaatctcaa      120
ggtagagtgg gaggtaatat cactacagtt accgctgagg gttttctttg ggaagaggga      180
cctaacagtt tctctcctac tccagaactc atgaagttag ctggtgatgt gggacttaaa      240
caggagttag tttttgcaga tagaaaaactt ccaagattcg tgtattggca aaacaaactt      300
caacctgttc caatgacacc tccagctatg atccaatctc agcttctttc ttttcctgga      360
aaacttagag ctttgttttg tgcacttggg ttcggttgctc cagcaatagg ttcaggattg      420
agtcaacagg gagatgaaga gactgtttct caatttttca gaaggcatct cggaacagaa      480
gttatgcaga gattagtggg gccatttgtt agtgggtgtg acgctggaga tcctcaacag      540
ctttctgctg ctgctgcttt cggtaggggtt acaaaaaatgg ctgatgtggg aggtggattg      600
atggctggag cactcttatt tgctagaaag aggccaaaac aaatgcctgc tgatcctaata      660
gttccttcaa ctagacctgg tgaattggga agttttaagc aaggtctcaa ggctcttcca      720
gaggcaatag ctgcacagct cggagataga gttaaggtag actggcacct tacaagattg      780
caaaggactg aaagagagac atatatgtct gtgttctcta ctctgatgg acaacaggaa      840
gttagggcaa gaacagttgt gcttaccact ccagcttaca tcaccgcaga acttttgcaa      900
ccacttcagc ctaaagtttag ttctgctttg caagcattca catatccaac cgttgcttgt      960
gttgtgttgg cataccctca gtcagatgtt aaggataaac tcgtgggttt tggaaatctt     1020
attcctagag gtcaaggaat caggactctc ggtacaatat ggacctcaag tttattcgct     1080
gatagagcac ctgctggatg gcaaaccctt tcttcataata ttggtggagc tactgatagt     1140
gagatcggtg acctcgattc tgaacagata gttagggagg tgcatagaga tttgtcaaga     1200
attttgctca agcctgatgt tcctcaacca aaagtgttgg ctgttaatgt gtggaagaga     1260
gcaataccac agtacaacct tggacacttt gataggttgc aacagattga tgaaggtctc     1320
aaatctttac ctggagttta tctctgttca aactacgttg gtggagtggc tttaggagat     1380
tgcgttagaa ggggattcga gagggcaaga gaggttggag aatacttaca aaacaaacaa     1440
tctgatacca ggtcaatctg a                                     1461
<210>      9
<211>      537
<212>      PRT
<213>      Arabidopsis thaliana
<220>
<221>      Peptit
<222>      (1)..(537)
<223>      AtPP01 thể đại
<400>      9
Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
  1          5          10          15
Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
  20          25          30
Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
  35          40          45
Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
  50          55          60
Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
  65          70          75          80
Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
  85          90          95
Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
  100         105         110
Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
  115         120         125
Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
  130         135         140
Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
  145         150         155         160
Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
  165         170         175
Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
  180         185         190
Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
  195         200         205
Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
  210         215         220
Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
  225         230         235         240
Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
  245         250         255
Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
  260         265         270
Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
  275         280         285
Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
  290         295         300
Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
  305         310         315         320
Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
  325         330         335
Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
  340         345         350
Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val

```

```

355          360          365
Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
370          375          380
Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
385          390          395          400
Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
405          410          415
Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
420          425          430
Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
435          440          445
Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
450          455          460
Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
465          470          475          480
Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
485          490          495
Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
500          505          510
Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
515          520          525
Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
530          535
<210> 10
<211> 1614
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana
<220>
<221> gen
<222> (1)..(1614)
<223> AtPPO1 thể đại
<400> 10
atggagttat ctcttctccg tccgacgact caatcgcttc ttccgctggt ttcgaagccc 60
aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccggt gttcagtggc cgggtggacca 120
accgtcggtat cttcaaaaaat cgaaggcgga ggaggcacca ccatcacgac ggattgtgtg 180
attgtcggcg gaggtattag tgggtctttgc atcgctcagg cgcttgetac taagcatcct 240
gatgctgctc cgaatttaat tgtgaccgag gctaaggatc gtgttgaggag caacattatc 300
actcgtgaag agaatggttt tctctgggaa gaagggtccca atagttttca accgtctgat 360
cctatgctca ctatgggtgt agatagtgtt ttgaaggatg atttggtggt gggagatcct 420
actgcgccaa ggtttgtgtt gtggaatggg aaattgaggc cggttccatc gaagctaaca 480
gacttaccgt tctttgattt gatgagtatt ggtgggaaga ttagagctgg ttttggtgca 540
cttgccattc gaccgtcacc tccagggtcgt gaagaatctg tggaggagtt tgtacggcgt 600
aacctcggtg atgaggtttt tgagcgctg attgaaccgt tttgttcagg tgtttatgct 660
ggtgatcctt caaaactgag catgaaagca gcgtttggga aggtttggaa actagagcaa 720
aatggtgtaa gcataatagg tggtaacttt aaggcaattc aggagaggaa aaacgctccc 780
aaggcagaac gagaccgcg cctgccaaaa ccacagggcc aaacagttgg ttctttcagg 840
aagggacttc gaatggtgcc agaagcaata tctgcaagat taggtagcaa agttaagttg 900
tcttggaagc tctcaggat cactaagctg gagagcggag gatacaactt aacatatgag 960
actccagatg gtttagtttc cgtgcagagc aaaagtgttg taatgacggt gccatctcat 1020
gttgcaagtg gtctcttgcg ccctctttct gaatctgctg caaatgcact ctcaaaaacta 1080
tattaccac cagttgcagc agtatctatc tctgaccgga aagaagcaat ccgaacagaa 1140
tgtttgatag atggtgaact aaagggtttt gggcaattgc atccacgcac gcaaggagtt 1200
gaaacattag gaactatcta cagctcctca ctctttccaa atcgcgacc gcccggaaga 1260
attttgctgt tgaactacat tggcgggtct acaaacaccg gaattctgtc caagtctgaa 1320
ggtgagttag tggaaagcgt tgacagagat ttgaggaaaa tgctaattaa gcctaattcg 1380
accgatccac ttaaattagg agttagggtg tggcctcaag ccattcctca gtttctagtt 1440
ggtcactttg atatccttga cacggctaaa tcattctctaa cgtcttcggg ctacgaaggg 1500
ctatttttgg gtggcaatta cgtcgctggt gtagccttag gccggtgtgt agaaggcgca 1560
tatgaaaccg cgattgaggt caacaacttc atgtcacggt acgcttataa gtaa 1614
<210> 11
<211> 537
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> AtPPO1 đột biến
<400> 11
Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
1 5 10 15
Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
20 25 30
Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
35 40 45
Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
50 55 60
Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
65 70 75 80
Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
85 90 95
Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
100 105 110

```



```

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
  115          120          125
Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
  130          135          140
Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
  145          150          155          160
Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
  165          170          175
Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
  180          185          190
Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
  195          200          205
Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
  210          215          220
Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
  225          230          235          240
Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
  245          250          255
Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
  260          265          270
Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
  275          280          285
Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
  290          295          300
Leu Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
  305          310          315          320
Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
  325          330          335
Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
  340          345          350
Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
  355          360          365
Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
  370          375          380
Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
  385          390          395          400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
  405          410          415
Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Asn Met Ile Gly Gly Ser Thr Asn
  420          425          430
Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
  435          440          445
Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
  450          455          460
Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
  465          470          475          480
Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
  485          490          495
Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
  500          505          510
Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
  515          520          525
Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
  530          535
<210> 12
<211> 473
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> CyPPO2 đột biến
<400> 12
Met Glu Leu Leu Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu
  1          5          10          15
Ser Leu Ala His Ala Leu His Lys Glu Ala Thr Ser Ala Ser Pro Leu
  20          25          30
Lys Ile Leu Val Ala Glu Ser Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr
  35          40          45
Thr Val Thr Ala Glu Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe
  50          55          60
Ser Pro Thr Pro Glu Leu Met Lys Leu Ala Val Asp Val Gly Leu Lys
  65          70          75          80
Gln Glu Leu Ile Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Phe Val Tyr Trp
  85          90          95
Glu Asn Lys Leu Gln Pro Leu Ser Phe Pro Gly Lys Leu Arg Ala Leu
  100          105          110
Phe Gly Ala Leu Gly Phe Val Ala Pro Ala Met Gly Asp Arg Leu Ser
  115          120          125
Gln Gln Gly Asn Glu Glu Thr Val Ser Gln Phe Phe Arg Arg His Leu
  130          135          140

```

Gly Thr Glu Val Met Gln Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly Val
 145 150 155 160
 Tyr Ala Gly Asp Pro Gln Gln Leu Ser Ala Ala Ala Phe Gly Arg
 165 170 175
 Val Ala Lys Met Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Leu
 180 185 190
 Leu Ser Ala Lys Asn Arg Pro Lys Lys Met Pro Ala Asp Pro Asn Val
 195 200 205
 Pro Lys Thr Lys Pro Gly Glu Leu Gly Ser Phe Lys Gln Gly Leu Lys
 210 215 220
 Ala Leu Pro Glu Ala Ile Ala Ala Lys Leu Gly Asp Arg Val Lys Leu
 225 230 235 240
 Asn Trp His Leu Thr Arg Leu Gln Arg Thr Glu Arg Glu Thr Tyr Ile
 245 250 255
 Ala Glu Phe Ser Thr Pro Asp Gly Gln Gln Glu Val Glu Ala Arg Thr
 260 265 270
 Val Val Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Asp Leu Leu Gln Pro
 275 280 285
 Leu Glu Pro Gln Val Ser Ser Ala Leu Gln Ala Phe Thr Tyr Pro Thr
 290 295 300
 Val Ala Ser Val Val Leu Ala Tyr Pro Gln Ser Asp Val Lys Gly Lys
 305 310 315 320
 Leu Val Gly Phe Gly Asn Leu Ile Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Cys
 325 330 335
 Leu Gly Thr Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ala
 340 345 350
 Gly Trp Gln Thr Leu Thr Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp Ser Glu
 355 360 365
 Ile Gly Asn Leu Asp Ser Glu Gln Ile Val Arg Glu Val His Arg Asp
 370 375 380
 Leu Ser Arg Ile Leu Leu Lys Pro Asp Val Pro Gln Pro Lys Val Leu
 385 390 395 400
 Thr Val Lys Leu Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly His
 405 410 415
 Phe Asp Arg Leu Gln Gln Ile Asp Glu Gly Leu Lys Ser Leu Pro Gly
 420 425 430
 Val Tyr Leu Cys Ser Asn Tyr Val Gly Gly Val Ala Leu Gly Asp Cys
 435 440 445
 Val Arg Arg Gly Phe Asp Arg Ala Arg Glu Val Gly Glu Tyr Leu Gln
 450 455 460

Lys Lys Gln Ser Asp Thr Arg Ser Ile
 465 470

<210> 13
 <211> 1422
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CyPPO2 đột biến
 <400> 13

atggaactat tagatacctt gattgtgggt gcgggtatta gcggtttgag tttggcgcac 60
 gcacttcaca aggaagcaac gagtgcacgc ccgctgaaga ttttagtcgc tgagagtcag 120
 ggacgtgtgg gcgggaacat cagcactgtg acagcagagg ggtttctctg ggaggagggc 180
 ccgaacagtt tttcgccgac gccggaattg atgaagttgg ctgtggatgt gggattgaag 240
 caggagttga tttttgccga tcgcaaattg cctcgttttg tgtattggga aaataagctg 300
 caaccgctga gttttccggg gaaactgcgg gcgttgttcg gggctttggg gtttgtcgcg 360
 ccggcaatgg gcgatcgact ttcgcagcag ggtaacgagg aaacagtttc tcaatttttc 420
 cgccgtcatc tcggtacgga agtgatgcag cggttggtgg aaccttttgt ttctgggggt 480
 tatgccggcg atccgcaaca acctagcgcg gcggcggttt ttggccgggt agccaagatg 540
 gctgatgtgg gtggcgggct ggtggcgggg gcgctgcttt ctgctaaaaa cagaccgaag 600
 aaaatgcctg cagaccgcaa tgttcctaaa actaagccgg gggagtggg ttcgttcaag 660
 caggggttga aggctttgcc agaggcgcac gctgctaagt tgggcgatcg agtgaaactc 720
 aactggcact tgactgcct ccagcgcaaa gaacgcgaaa cttacattgc tgaattctcg 780
 acgcccagac gacagcagga agttgaggcg gcgaccgtgg ttttgacaac gcccgcttac 840
 gttacagccg atttggttga acctctggaa ccgcaagtta gcagcgcttt acaagctttt 900
 acttatccta cggttgctc cgttgtctta gcataccgcg agtcggatgt caagggtaaa 960
 ttagtgggtt ttggaaattt aattccgagg ggcgagggaa ttcgctgtct cgggacgatt 1020
 tggacatcga gtttatttcc cgatcgcgcg cctgcagggt ggcaaaactct caccagttac 1080
 atcggcgggg caacagactc ggaattggc aatctcgact cagaacaaat cgttcgggag 1140
 gtacaccgag atttgtctcg gattttgctg aaaccagatg tgccacagcc aaaagtttta 1200
 acggtgaagc tttggaaacg gcgattcct cagtacaatt tggggcattt cgatcgctg 1260
 caacaaatcg atgagggtt aaaatctttg cctggagtgt atttgtgcag caactacgtt 1320
 ggcggagtgg ctttgggaga ttgcgtgcga aggggtttcg atcgtgcgcg agaagtgggc 1380
 gagtatttgc agaagaaaca atcagatact cgatcgatct ga 1422

<210> 14
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> CyPPO4 đột biến
 <400> 14

Met Thr His Val Leu Asp Ser Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Ala His Ala Leu His Gln Asn Gln Asp His Gln Leu Pro
 20 25 30
 Leu Asn Ile Leu Val Ser Glu His Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile
 35 40 45
 Thr Thr Val Ser Glu Gly Glu Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser
 50 55 60
 Phe Ser Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Leu Ala Val Glu Val Gly Leu
 65 70 75 80
 Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Tyr Val Tyr
 85 90 95
 Trp Asn Gly Gln Leu Met Pro Leu Ser Pro Gly Gly Lys Leu Arg Ala
 100 105 110
 Leu Thr Gly Ala Leu Gly Phe Val Gln Pro Ala Met Gly Glu Ser Leu
 115 120 125
 Ser Gln Gln Asn Gly Glu Glu Thr Ile Ser Gln Phe Phe Glu Arg His
 130 135 140
 Leu Gly Ser Glu Val Leu Lys Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly
 145 150 155 160
 Val Tyr Ala Gly Asp Pro Gln Gln Leu Glu Ile Ser Ser Ala Phe Ala
 165 170 175
 Arg Val Ala Arg Met Ala Tyr Ser Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala
 180 185 190
 Val Leu Ser Arg Arg Gln Asn Lys Ser Pro Arg Ser Pro Ala Asp Pro
 195 200 205
 Ser Ile Pro Gln Thr Lys Arg Gly Glu Leu Gly Ser Phe Arg Gln Gly
 210 215 220
 Ile Gly Ala Leu Pro Asn Ala Ile Ala Lys Gln Leu Gly Asp Gln Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Asn Trp Gln Leu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Glu Asn Gln Thr
 245 250 255
 Tyr Arg Ala Glu Phe Ser Thr Pro Glu Gly Val Gln Gln Val Glu Thr
 260 265 270
 Arg Thr Val Val Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Glu Ile Leu
 275 280 285
 Lys Pro Leu Gln Leu Gln Val Ser Gln Thr Leu Thr Glu Ile Pro Tyr
 290 295 300
 Pro Pro Val Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Val Ser Ala Leu Lys
 305 310 315 320
 Gln Lys Leu Thr Gly Phe Gly Asn Leu Val Pro Arg Gly Gln Gly Ile
 325 330 335
 Arg Thr Leu Gly Thr Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala
 340 345 350
 Pro Gln Gly Trp Gln Val Leu Thr Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp
 355 360 365
 Pro Glu Ile Gly Glu Leu Glu Asp Asp Gln Ile Val Glu Ala Val His
 370 375 380
 Gln Asp Leu Arg His Ile Leu Leu Lys Glu Asp Ile Ser Pro Lys Val
 385 390 395 400
 Leu Ala Val His Leu Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly
 405 410 415
 His Gln Gln Arg Leu Gln His Val Asn Glu Gly Leu Glu Ala Met Pro
 420 425 430
 Gly Leu Tyr Leu Cys Ser Asn Tyr Ile Asp Gly Val Ala Leu Gly Asp
 435 440 445
 Cys Val Arg Arg Ser Ile Gly Gln Ala Asn Glu Ile Leu Ser Phe Leu
 450 455 460

Gly Gln

465

<210> 15

<211> 1401

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CyPPO4 đột biến

<400> 15

atgactcagc tactcgatag tttaatcgtc ggtgcaggca ttagcggcct ggcgttagct 60
 catgctctcc atcagaacca agatcatcaa ttgcctctca acattcttgt cagcgagcat 120
 caaggacggg taggaggaaa tataaccaca gtatccgaag gagaatttct ttgggaagaa 180
 ggccccaata gtttttctcc aaccctgag ttactgaagt tagcggtaga agtaggtctt 240
 aagcctgagc tagtctttgc cgatcgcaag ttacctcggc acgtttactg gaatggtcaa 300
 ctcatgcctt taagtccctgg aggtaaactt cgagcattaa cggggggcatt ggggtttgta 360
 caaccgcga tgggagaatc gttaatgcaa caaaatgggg aagaaacgat ctcgcagttt 420
 tttgagcgtc atttgggttc agaagtcttc aagcgactgg ttgaaccctt tgtttctggt 480
 gtttatgcag gcgatcccca gcaactcgaa attagctcgg cttttgcccg agtcgcacgt 540
 atggcttaca gtggcggtgg attggttgct ggagcggttt tatcgcgtcg tcagaacaaa 600
 tctccgcgat cgctgccga ccgctctatt ccccaacta aacggggaga gttgggggtct 660
 tttcgtcagg ggattggagc cttaccctaat gcgatcgcca aacagttagg cgatcaactc 720
 aaattaaact ggcaactcac ccgtctcgaa cgactgaaa accaaaccta tcgggctgaa 780

```

ttttcgactc cagaaggggt tcaacaggta gaaactcgaa cgggtggtgtt gacgactccg      840
gcctatgtca cagcagaaat tctcaaaccg ttgcaactcc aagtcagtca aacgttaact      900
gaaattccct atcccccggt ggcttgcgtc gttttagcct atcccgtttc agctttaaag      960
cagaaattaa ccggatttgg caatttagtt ccccgaggac aagggttcg gacgttaggc     1020
acgatttgga catcgagttt atttcctggt cgcgcccccc aaggctggca agtcctcacc     1080
agtttatatt gcggagcgac ggatccagaa attggagagt tagaagatga tcaaattggt     1140
gaggcgggtt atcaagattt gcgtcacatt ttactcaaag aagatatctc tcccaaagtg     1200
ctagccgtgc atctgtggaa acgtgctatc cctcaatata atctcggaca ccaacaacgg     1260
ttacaacacg ttaatgaggg tctagaggca atgccggggg tatactctgt tagcaactat     1320
atcgacgggt tagcgttggg agattgtgtg cgctgttcta tcggacaagc taacgaaatt     1380
ctcagttttt tgggtcaata g                                     1401
<210>      16
<211>     453
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo
<220>
<223>      CyPPO8 đột biến
<400>      16
Met Ile Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Ser Ala
 1           5           10           15
Ala Tyr Arg Leu Asp Glu Lys Gln Arg Gln Val Leu Val Ala Glu Lys
 20           25           30
Arg Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Ser Gln Gln Ser Gly Asp Phe
 35           40           45
Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Ser Pro Thr Pro Glu Leu Leu
 50           55           60
Lys Leu Ala Val Asp Ala Gly Leu Arg Asn Glu Leu Ile Phe Ala Asp
 65           70           75           80
Arg Gly Leu Pro Arg Tyr Val Tyr Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Leu
 85           90           95
Ser Pro Ile Gly Lys Leu Arg Ala Leu Thr Gly Ala Leu Gly Phe Ile
100          105          110
Pro Pro Gln Val Ser Ser Gln Glu Thr Val Ala Asp Phe Phe Thr
115          120          125
Arg His Leu Gly Ser Glu Val Ala Gln Arg Leu Val Ser Pro Phe Val
130          135          140
Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Val Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ala Ala
145          150          155          160
Phe Gly Arg Val Thr Gln Leu Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Val Ala
165          170          175
Gly Ala Ile Leu Cys Arg Arg Gln Lys Pro Lys Ser Thr Pro Lys Thr
180          185          190
Ala Lys Pro Ser Asp Ile Pro Glu Thr Lys Ser Gly Gln Leu Gly Ser
195          200          205
Phe Lys Glu Gly Leu Gln Gln Leu Pro Ser Ala Ile Val Ser Gln Leu
210          215          220
Gly Asp Lys Val Lys Phe Gln Trp Glu Leu Lys Asn Ile Ser Pro His
225          230          235          240
Pro Glu Ser Gly Tyr Val Ala Thr Phe Ser Thr Pro Glu Gly Glu Gln
245          250          255
Thr Val Glu Ala Lys Thr Val Ile Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr
260          265          270
Ala Ser Leu Val Lys Asp Leu Ser Pro Gln Ala Ser Gln Ala Leu Asn
275          280          285
Glu Ile Ser Tyr Pro Pro Val Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Asp
290          295          300
Glu Ala Leu Arg Phe Pro Leu Lys Gly Phe Gly Asn Leu Asn Pro Arg
305          310          315          320
Ser Gln Gly Ile Arg Thr Leu Gly Thr Ile Trp Ser Ser Thr Leu Phe
325          330          335
Pro Gly Arg Thr Pro Lys Gly Trp His Leu Leu Thr Asn Phe Ile Gly
340          345          350
Gly Ala Thr Asp Pro Ala Ile Ala Glu Leu Ser Glu Asp Gln Ile Ile
355          360          365
Glu Gln Val His Gln Asp Leu Gln Gln Ala Val Ile Lys Ser Gly Ser
370          375          380
Ile Pro Lys Pro Leu Ala Val His Leu Trp Ser Lys Ala Ile Pro Gln
385          390          395          400
Tyr Asn Leu Gly His Leu Lys Arg Leu Glu Thr Ile Arg Asn His Leu
405          410          415
Lys Pro Phe Ser Gly Leu Phe Leu Ser Ser Asn Tyr Leu Asp Gly Val
420          425          430
Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Gln Ala Val
435          440          445
Leu Asp Tyr Leu Gly
450
<210>      17
<211>     1362
<212>      ADN
<213>      Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> CyPPO8 đột biến
<400> 17
atgatagata ctttaattgt gggagcaggg attagtgggt taagtgctgc gtatcgactc 60
gatgagaagc agcgccaagt gctgggtgca gaaaagcgcg atcgcgctgg gggaaatatt 120
accagccaac aaagtggcga ttctctctgg gaagaaggac cgaacagttt ttctcccaca 180
ccagaactcc taaaactagc ggttgatgcg ggcttaagaa atgagttaat ctttgctgat 240
cgcggaactc ccggttatgt ttattgggag gggaaactgc gccctctgag tccaatcggg 300
aaactacggg cgtaacggg tgcattaggc ttatttcccc cgcaagtgtc gagtcaggaa 360
gaaacggttg cggacttttt taccctcat ctcggttcag aagtagccca acggttagtg 420
agtcggtttg tgtctggggt ttatgcaggg gatgtggatc aactcagtg ggaagctgca 480
tttgacgag ttaccaact ggcggatgtg ggcggtggac tggtcgcagg tgcgatttta 540
tgtctgctgc aaaagccaaa gtcaacccca aaaacggcta aaccgtctga tattccagaa 600
acaagtctg gacagttagg ttcatTTaag gaaggattac aacaattacc cagcgcgatc 660
gtttctcaac tgggagacaa agtaaagttt caatgggaac tgaaaaatat ctcccctcat 720
ccagaatcgg gttacgtcgc gacattttcc acaccagagg gagaacaaac agtcgaagcc 780
aaaaccgtta tcctcaccac tcccgcttac gttaccgctt ctctgggtcaa agatttatca 840
cctcaagcca gtcaagcctt aaacgaaatt tcctatcccc ccgtagcttg tgtggtctta 900
gcctatcccg atgaagccct ccgttttccc ctcaaaggat ttggtaatct taaccctcgc 960
agtcaaggaa tccgcactct tggtaacaatt tggagttcaa cactctttcc aggacgcag 1020
ccgaaagggt gccatctctt aaccaatttt attggcgggt caactgatcc cgcaattgct 1080
gaactcagtg aagatcaaat tattgaacaa gtccatcaag acttacaaca agcggtgatt 1140
aaatcgggaa gtatcccgaa acccttagcc gttcatttgt ggtcaaaagc gattccgcaa 1200
tacaatctcg gacatctgaa acggttagaa accatccgca atcaactaaa acccttctct 1260
ggactctttt tatcgagtaa ctatctcgat ggcgttgctg tgggtgattg tgtgcgcga 1320
ggggaagaga gtagtcaagc cgtgttagat tatttgggtt aa 1362
<210> 18
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi PCC7112_BmHIF
<400> 18
ccccggatcc atggaactat tagatacctt gattgtggg 39
<210> 19
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi PCC7112_StuIR
<400> 19
cccaggcctg atcgatcgag tatctgattg 30
<210> 20
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi PCC7418_BmHIF
<400> 20
ccccggatcc atgatagata cttaattgt ggg 33
<210> 21
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi PCC7418_XhoIR
<400> 21
ccccctcgag acccaaataa tctaacacgg 30
<210> 22
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi PCC8106_BglIIF
<400> 22
cccagatct atgactcacg tactcgatag 30
<210> 23
<211> 34
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi PCC8106_XhoIR
<400> 23
ccccctcgag ttgacccaaa aaactgagaa ttct 34
<210> 24
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO12_BamHIF

```

```

<400> 24
ccccgcatcc atggaactct tggataactct 30
<210> 25
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO12_XhoIR
<400> 25
ccccctcgag gattgacctg gtatcagatt 30
<210> 26
<211> 212
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Sản phẩm PCR của peptit vận chuyển lục lập
<400> 26
tctagaatgg agttatctct tctccgtccg acgactcaat cgcttcttcc gtcgttttcg 60
aagcccaatc tccgattaaa tgtttataag cctcttagac tccgttggtc agtggccggt 120
ggaccaaccg tcgcatcttc aaaaatcgaa ggcggaggag gcctcgaggc gcgccggggc 180
caggcctacg cgtttaatta aacctaggat cc 212
<210> 27
<211> 156
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Peptit vận chuyển lục lập
<400> 27
atggagttat ctcttctccg tccgacgact caatcgcttc ttccgtcggt ttcgaagccc 60
aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccgtt gttcagtggt cggtggacca 120
accgtcggat cttcaaaaat cgaaggcgga ggaggc 156
<210> 28
<211> 72
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Trình tự đánh dấu hemagglutinin
<400> 28
atgtatcctt atgatgttcc agattatgct agtcttatgt acccatacga cgtgcctgac 60
tacgcatcat tg 72
<210> 29
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO2Nt98%_F
<400> 29
atctgatcaa aagcaatctt ctgagttttc cggggaaac 39
<210> 30
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO2Nt98%_R
<400> 30
caattggatt tgaaggtaac ggttgcagct tattttcc 38
<210> 31
<211> 40
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO4-Nt-98%_F
<400> 31
atctgatcaa aagcaatctt ttaagtcctg gaggtaaact 40
<210> 32
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO4-Nt-98%_R
<400> 32
caattggatt tgaaggtaaa ggcattgagt gaccattc 38
<210> 33
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi CyPPO8_Nt98%-F
<400> 33
atctgatcaa aagcaatctt ctgagtccaa tcgggaaac 39

```

<210> 34
<211> 39
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mồi CyPP08_Nt98%-R
<400> 34
caattggatt tgaaggtaaa gggcgagtt tcccctccc 39