



(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)



1-0033246

(51)⁷ C12N 15/82; C12N 15/09

(13) B

(21) 1-2016-04840

(22) 04/03/2016

(86) PCT/IN2016/050078 04/03/2016

(87) WO 2016/139682 09/09/2016

(30) 627/DEL/2015 05/03/2015 IN

(45) 25/09/2022 414

(43) 25/04/2017 349A

(73) MAHYCO PRIVATE LIMITED (IN)

19 Raj Mahal, 84 Veer Nariman Road, Mumbai, Maharashtra 400020, India

(72) KHANALE, Vaishali Praveen (IN); BHATTACHARYA, Anjanabha (IN);
BANDYOPADHYAY, Anindya (PH).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CẤU TRÚC ADN CHỨA TRÌNH TỰ KHỞI ĐẦU CỦA CÂY BÔNG, THỰC VẬT
CHUYỂN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC VẬT CHUYỂN GEN
CHỨA CẤU TRÚC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu của cây bông, được viết tắt là “p2”, biểu hiện hoạt tính trình tự khởi đầu. Bất ngờ là trình tự khởi đầu này cũng bị ảnh hưởng bởi áp lực nước hoặc muối. Phân tích khuyết cho thấy yếu tố/motif ngược chiều trong trình tự khởi đầu ảnh hưởng đến hoạt tính của trình tự khởi đầu, và các trình tự có khả năng đáp ứng áp lực muối hoặc nước.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sinh học phân tử thực vật và kỹ thuật di truyền. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập và phân tích đặc điểm của trình tự khởi đầu cảm ứng thu được từ cây bông.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trình tự khởi đầu chứa trình tự ADN đặc hiệu và các yếu tố đáp ứng tạo ra vị trí liên kết an toàn ban đầu cho ARN polymeraza và protein được gọi là các yếu tố phiên mã tiếp nhận ARN polymeraza. Các yếu tố phiên mã này có các trình tự hoạt hóa hoặc ức chế đặc hiệu của nucleotit tương ứng gắn với trình tự khởi đầu đặc hiệu và điều hòa sự biểu hiện gen.

Trình tự khởi đầu được sử dụng trong công nghệ sinh học có nhiều loại khác nhau, phụ thuộc vào kiểu kiểm soát sự biểu hiện gen được dự định. Có nhiều trình tự khởi đầu của cây đã được ghi nhận trong tài liệu. Các trình tự khởi đầu của cây này thực hiện chức năng như công cụ hữu hiệu để biểu hiện protein hoặc peptit trong cây hoặc tế bào cây chuyển gen hoặc theo cách khác để bất hoạt các gen hoặc họ gen. Trình tự khởi đầu thường được chia thành các nhóm có tên sau đây: trình tự khởi đầu cơ định, trình tự khởi đầu cảm ứng, trình tự khởi đầu điều khiển sự phát triển và trình tự khởi đầu đặc hiệu mô.

Trình tự khởi đầu cơ định điều khiển sự biểu hiện trong hầu hết các mô và phần lớn độc lập với các yếu tố môi trường và phát triển. Do sự biểu hiện của chúng thường không được điều hòa bằng các yếu tố nội sinh, nên các trình tự khởi đầu cơ định thường có thể hoạt động ở các loài khác nhau và thậm chí ở các giới khác nhau.

Nhiều trình tự khởi đầu có vai trò trong tế bào cây đã biết trong tình trạng kỹ thuật và sẵn sàng để sử dụng trong polynucleotit tái tổ hợp để biểu hiện các gen mong muốn trong tế bào cây chuyển gen.

US5510474 mô tả trình tự khởi đầu ubiquitin của cây ngô; US5850018 đã mô tả trình tự khởi đầu/dẫn đầu ZMDJ1 của nó và US 20110167518 đã mô tả trình tự khởi đầu

sark của cây ngô.

Trình tự khởi đầu virus có thể lây nhiễm vào cây ít được ưu tiên để biến nạp các loài thực vật chủ, do việc nhiễm các virus vào vào cây có thể gây cảm gen chuyển (Seemanpillai et al., 2003, *Mol Plant Microbe Interact.* 16(5): 429-438; Al-Kaffef al, 2000, *Nat Biotechnol.* 18: 995-9).

Trình tự khởi đầu cơ định thường được sử dụng hiện nay là trình tự khởi đầu 35S hoặc trình tự khởi đầu 35S được tăng cường (“trình tự khởi đầu 35S”) của virus gây bệnh khảm ở súp lơ (CaMV) của các thể phân lập CM 1841 (Gardner et al., 1981, *Nucleic acid Research* 9, 2871-2887) CabbB-S (Franck et al, 1980, *Cell* 21, 285-294) và CabbB-JI (Hull và Howell, 1978, *Virology* 86, 482-493); trình tự khởi đầu 35S đã được Odell et al (1985, *Nature* 313, 810-812) mô tả.

WO 2007069894 đã mô tả hoạt tính của trình tự khởi đầu CaMV35S trong cây chuyển gen nhạy với áp lực phi sinh học, đặc biệt là áp lực nhiệt xuất hiện khi cây chuyển gen được trồng trên cánh đồng ở Tây Ban Nha.

Do đó vẫn có nhu cầu phát triển các trình tự khởi đầu cơ định khác nhau của cây để sử dụng trong phương pháp sắp xếp gen, do việc sử dụng một vài trình tự khởi đầu giống nhau có thể dẫn đến bất hoạt gen (Yang et al, 2005, *Plant Mol Biol.* 58: 351-366).

Việc phân lập và đặc trưng hóa chức năng của trình tự khởi đầu liên quan đến việc ubiquitin hóa của bông và 5'UTR điều khiển mức biểu hiện tăng trong mô rễ và hoa đã được mô tả. uceAl.7 là trình tự điều hòa cơ định mạnh bao gồm trình tự khởi đầu (uceApro2) và 5'UTR của nó hữu dụng đối với sự biến nạp di truyền của cây hai lá mầm, rất có tiềm năng trong việc điều khiển mức biểu hiện cao của gen chuyển ở cây trồng, cụ thể là đối với các tính trạng mong muốn ở mô hoa và mô rễ (Viana et al, 2011, *BMC Biotechnology*, 11: 115). Trình tự khởi đầu từ bông đặc hiệu với các mô màu xanh lá cây, sự hình thành chồi hoa (với hoạt tính thấp hơn trong các mô sinh dưỡng), hạt và sợi được bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật.

Với mong muốn từ quan điểm quản lý là sử dụng trình tự khởi đầu có nguồn gốc từ thực vật để tạo ra cây chuyển gen. Vì thế, các trình tự khởi đầu cơ định mới có nguồn gốc thực vật được yêu cầu, điều hòa sự biểu hiện gen chuyển tích cực để đáp ứng với áp lực bất lợi của môi trường. Trình tự khởi đầu này sẽ trực tiếp hỗ trợ cho lĩnh vực công

ngệ sinh học thực vật để phát triển năng suất cây trồng để đảm bảo an ninh lương thực toàn cầu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế xuất vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của

nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại, trong đó tế bào chủ này có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm hoặc thực vật.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại, trong đó tế bào chủ này có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, chứa trong bộ gen của nó cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong

điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây chuyển gen chứa trong bộ gen của nó cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại; hoặc có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. phương pháp này bao gồm: (a) thu được (các) tế bào cây; (b) thu được cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (i) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (ii) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (iii) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại; hoặc tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với

đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại, trong đó tế bào chủ này có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm; (c) biến nạp (các) tế bào cây này với cấu trúc ADN này, hoặc tế bào chủ tái tổ hợp này để thu được (các) tế bào cây biến nạp; và (d) lựa chọn (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện gen quan tâm này.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. phương pháp này bao gồm: (a) thu được (các) tế bào cây; (b) thu được cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (i) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (ii) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (iii) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại; hoặc tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại, trong đó tế bào chủ này có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm; (b) biến nạp (các) tế bào cây với cấu trúc ADN này, hoặc tế bào chủ tái tổ hợp này để thu được (các) tế bào cây biến nạp; và (c) chọn lựa (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện khác loại gen quan tâm này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các hình vẽ sau đây là một phần của bản mô tả và được bao gồm để minh họa thêm các khía cạnh của sáng chế. Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn bằng cách tham khảo các hình vẽ kết hợp với phần mô tả chi tiết các hình vẽ cụ thể được trình bày trong bản mô tả này.

Fig. 1 là bản đồ vectơ biểu hiện của pMDC p2, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 2 là ảnh thể hiện sự biểu hiện GUS được điều khiển bởi trình tự khởi đầu p2 ở lúa gạo và bông, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 3 là ảnh thể hiện biểu hiện GUS được điều khiển bởi trình tự khởi đầu p2 ở cây Arabidopsis, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 4 là đồ thị định lượng GUS ở lúa gạo được điều khiển bởi trình tự khởi đầu p2 hoặc 35S, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 5A-B là bản đồ vectơ của pMDC p2Δ1, và cấu trúc p2Δ2 tương ứng, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 6A-B là ảnh thể hiện kiểu biểu hiện GUS hóa mô ở cây Arabidopsis được điều khiển bởi pMDCp2A1, và pMDCp2A2, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 7 là ảnh thể hiện kiểu biểu hiện GUS hóa mô ở bông sự kiện p2 (CT/pMDCp2-Exp.2-1B-1, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 8 là ảnh thể hiện kiểu biểu hiện GUS hóa mô ở cây T3 Arabidopsis p2 pMDCp2-1-4-1-4, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 9 là đồ thị thể hiện hoạt tính của trình tự khởi đầu p2 ở Arabidopsis dưới áp lực muối tại các thời điểm khác nhau, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 10 là ảnh kiểu biểu hiện GUS hóa mô được điều khiển bởi p2 ở cây Arabidopsis dưới áp lực muối tại các thời điểm khác nhau, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 11 là đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng của hoạt tính trình tự khởi đầu p2 ở lúa gạo dưới áp lực muối tại các thời điểm khác nhau, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 12 là ảnh thể hiện kiểu biểu hiện GUS hóa mô được điều khiển bởi p2 ở lúa gạo dưới áp lực muối tại các thời điểm khác nhau, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 13 là đồ thị thể hiện sự ảnh hưởng của hoạt tính trình tự khởi đầu p2 ở *Arabidopsis* dưới áp lực nước tại các thời điểm khác nhau, theo một phương án của sáng chế.

Fig. 14 là đồ thị định lượng GUS từ các mẫu biến nạp p2Δ1 và p2Δ2 lúa gạo (lá), theo một phương án của sáng chế.

Fig. 15 là đồ thị định lượng GUS từ các mẫu biến nạp p2Δ1 và p2Δ2 lúa gạo (rễ), theo một phương án của sáng chế.

Fig. 16 đồ thị thể hiện kiểu biểu hiện GUS hóa mô ở cây lúa gạo được điều khiển bởi pMDCp2, pMDCp2A1, và pMDCp2A2, theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được rằng sáng chế được mô tả trong bản mô tả này được dự định bao gồm các biến đổi và cải biến khác với các phương án được mô tả cụ thể. Nên hiểu rằng sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bao gồm tất cả các biến đổi và cải biến này. Sáng chế cũng bao gồm tất cả các bước, dấu hiệu, chế phẩm và hợp chất để chỉ hoặc được nêu trong bản mô tả này, riêng rẽ hoặc kết hợp, và sự kết hợp bất kỳ và toàn bộ của bất kỳ hoặc nhiều bước hoặc dấu hiệu này.

Định nghĩa

Để thuận tiện, trước khi mô tả chi tiết sáng chế, các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả, ví dụ và yêu cầu bảo hộ được bao gồm trong phần này. Các định nghĩa này nên được đọc đồng thời tham khảo phần còn lại sáng chế và được hiểu như cách hiểu của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa như được biết và được hiểu với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, tuy nhiên, để thuận tiện và đầy đủ, các thuật ngữ cụ thể và nghĩa của chúng được nêu dưới đây.

Mạo từ “một” được sử dụng chỉ một hoặc nhiều hơn một (tức là ít nhất một) đối tượng ngữ pháp của mạo từ.

Thuật ngữ “nhiều” có nghĩa là nhiều hơn một.

Các thuật ngữ “ít nhất hai”, “nhiều hơn một” và “nhiều” được sử dụng thay đổi cho nhau.

Các thuật ngữ “bao gồm” và “gồm” được sử dụng trong theo nghĩa rộng, mở, có nghĩa là các thành phần bổ sung có thể được bao gồm. Nó không được dự định để hiểu là “chỉ bao gồm”.

Trong bản mô tả này, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu khác từ “bao gồm”, và các biến thể như “chứa” và “gồm có”, sẽ được hiểu để ngụ ý bao gồm yếu tố hoặc bước hoặc nhóm của yếu tố hoặc bước được nêu nhưng không loại trừ yếu tố hoặc bước hoặc nhóm của các yếu tố hoặc bước khác bất kỳ. Thuật ngữ “bao gồm” được dùng có nghĩa là “bao gồm nhưng không bị giới hạn ở”. “Bao gồm” và “bao gồm nhưng không bị giới hạn ở” được sử dụng thay đổi cho nhau.

Thuật ngữ “trình tự nucleotit” có nghĩa là trình tự trong đó nucleotit được nằm trong một chuỗi tương đối với nhau.

Thuật ngữ “gen/ADN khác loại” chỉ trình tự ADN có nguồn gốc lạ được chèn vào bộ gen của thực vật.

Thuật ngữ “polynucleotit” hoặc “phân tử polynucleotit” hoặc “trình tự polynucleotit” được sử dụng trong bản mô tả này chỉ ADN hoặc ARN mạch đơn hoặc mạch kép của bộ gen hoặc có nguồn gốc tổng hợp, tức là polyme của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc ribonucleotit, tương ứng, được đọc từ đầu 5' (ngược chiều) đến đầu 3' (xuôi chiều).

Thuật ngữ “trình tự nucleotit” theo sáng chế chỉ trình tự của phân tử polynucleotit.

Thuật ngữ “trình tự khởi đầu” theo sáng chế chỉ phân tử polynucleotit ở trạng thái nguyên thể hoặc không nguyên thể của nó được bố trí ngược chiều về phía đầu 5' với codon khởi đầu dịch mã của khung đọc mở (hoặc vùng mã hóa protein) và được tham gia vào sự nhận diện và liên kết của ARN polymeraza II và các protein khác (các yếu tố phiên mã tác động kiểu trans) để khởi đầu phiên mã

“Trình tự khởi đầu của cây” là trình tự khởi đầu nguyên thể hoặc không nguyên thể có vai trò trong tế bào cây. Trình tự khởi đầu cơ định của cây có vai trò trong hầu hết hoặc tất cả các mô của cây trong suốt quá trình phát triển của cây. Trình tự khởi đầu của cây bất kỳ có thể được sử dụng là yếu tố điều hòa 5' để điều biến sự biểu hiện của một gen cụ thể hoặc gen được liên quan có điều khiển. Khi được liên kết có điều khiển với phân tử polynucleotit, trình tự khởi đầu thường khiến cho phân tử polynucleotit được

phiên mã theo cách tương tự với sự phiên mã của polynucleotit mà trình tự khởi đầu thường được liên quan.

Các thuật ngữ “mã hóa” và “tạo mã” chỉ quá trình mà polynucleotit, thông qua cơ chế phiên mã và dịch mã, cung cấp thông tin từ tế bào từ đó chuỗi axit amin có thể được lắp ráp thành polypeptit cụ thể. Do sự thoái hóa của mã di truyền, sự thay đổi bazơ nhất định trong trình tự ADN không làm thay đổi trình tự axit amin của protein.

Thuật ngữ “biểu hiện” liên quan đến trình tự gen chỉ phiên mã của gen và, khi thích hợp, dịch mã của sản phẩm phiên mã mRNA thu được thành protein. Vì thế, như sẽ được rõ ràng theo ngữ cảnh, biểu hiện của protein thu được từ sự phiên mã và dịch mã trình tự khung đọc mở.

Cụm từ “sự biểu hiện được biến đổi” khi nói đến polynucleotit cho biết kiểu biểu hiện trong, ví dụ, cây hoặc mô cây chuyển gen, khác với kiểu biểu hiện ở cây kiểu dại thuộc cùng loài. Vì thế, polynucleotit quan tâm được biểu hiện trong loại tế bào hoặc loại mô khác với loại tế bào hoặc loại mô trong đó trình tự được biểu hiện trong cây kiểu dại, hoặc bằng cách biểu hiện tại thời điểm khác với thời điểm trình tự được biểu hiện trong cây kiểu dại, hoặc bằng sự đáp ứng với các chất cảm ứng khác nhau, như hormon hoặc các tín hiệu môi trường, hoặc ở mức biểu hiện khác nhau, so với sự biểu hiện được phát hiện trong cây kiểu dại. Các biểu hiện thu được có thể tạm thời hoặc ổn định, cơ định hoặc cảm ứng. Khi nói đến polypeptit, “sự biểu hiện được biến đổi” có thể cũng liên quan đến mức độ hoạt tính thay đổi do mức protein thay đổi hoặc do sự tương tác của polypeptit với chất điều biến ngoại sinh hoặc nội sinh, hoặc từ sự tương tác với các yếu tố hoặc do kết quả của sự biến đổi hóa học của polypeptit.

Các thuật ngữ “axit nucleic ngoại sinh” và “axit nucleic khác loại” được sử dụng thay đổi cho nhau và chỉ axit nucleic, ADN hoặc ARN, được đưa vào trong tế bào (hoặc dạng nguyên thủy của tế bào) bằng sự nỗ lực của con người. Các axit nucleic ngoại sinh này có thể là bản sao của một trình tự được tìm thấy trong tự nhiên trong tế bào mà nó được đưa vào, hoặc mảnh của chúng.

Thuật ngữ “axit nucleic nội sinh” chỉ phân tử axit nucleic, gen, polynucleotit, ADN, ARN, mRNA, hoặc cADN có mặt trong cây hoặc sinh vật được thiết kế di truyền. Trình tự nội sinh là “nguyên thể” với, tức là của chính cây hoặc sinh vật được thiết kế di truyền.

Cụm từ “trình tự tương đồng” chỉ trình tự polynucleotit hoặc polypeptit tương tự với tổ tiên chung và sự bảo toàn trình tự. Trình tự tương đồng có thể là “thể tương đồng khác loài” nếu chúng được tách bởi sự kiện hình thành loài, hoặc “thể tương đồng cùng loài” nếu chúng được tách bởi sự kiện lặp lại gen. Cụm từ “thể tương đồng chức năng” chỉ trình tự polynucleotit hoặc polypeptit tương tự với tổ tiên chung và sự bảo toàn trình tự và có chức năng giống hệt hoặc tương tự ở mức độ xúc tác, tế bào, hoặc sinh vật.

Thuật ngữ “cấu trúc ADN tái tổ hợp” có nghĩa là phân tử được tạo cấu trúc bên ngoài tế bào sống bằng cách liên kết ADN tự nhiên hoặc tổng hợp với phân tử ADN có thể sao chép trong tế bào sống.

“Vector” có nghĩa bất kỳ là axit nucleic có thể được sinh sản và/hoặc được chuyển giữa sinh vật, tế bào hoặc thành phần tế bào. Vector bao gồm virus, thực khuẩn thể, tiền virus, plasmid, phagemid, transposon và nhiễm sắc thể nhân tạo như YACs (nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men), BACs (nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn), và PLACs (nhiễm sắc thể nhân tạo cây), và dạng tương tự, là “episom”, mà tự động tái bản hoặc có thể tích hợp vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Vector cũng có thể là polynucleotit ARN trần, polynucleotit bao gồm cả ADN và ARN trong cùng một sợi, ADN hoặc ARN được liên hợp poly-lysin, ADN hoặc ARN được liên hợp peptit, ADN được liên hợp liposom, hoặc dạng tương tự, về bản chất không phải là episom, hoặc nó có thể là sinh vật chứa một hoặc nhiều cấu trúc polynucleotit nêu trên như *Agrobacterium* hoặc vi khuẩn.

Thuật ngữ “vector tái tổ hợp” có nghĩa là vector mang mảnh ADN lạ.

“Sự biến nạp” chỉ quá trình nhờ đó phân tử ADN tái tổ hợp được đưa vào trong tế bào chủ. Sự biến nạp (hoặc tải nạp, hoặc chuyển nhiễm), có thể đạt được bằng cách bất kỳ trong số nhiều cách bao gồm điện di, vi tiêm, bắn gen (hoặc phân phối bằng súng bắn hạt), hoặc biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*

Thuật ngữ “tế bào chủ tái tổ hợp” có nghĩa là tế bào chủ mang vector tái tổ hợp

Thuật ngữ “cây chuyển gen” có nghĩa là được thiết kế di truyền với việc đưa vào theo cách nhân tạo một gen hoặc bộ trình tự gen vào trong bộ gen của cây

Thuật ngữ “p2” chỉ mảnh nucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 1 thể hiện hoạt tính như trình tự khởi đầu.

Thuật ngữ “p2Δ1” chỉ mảnh nucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 9 thể hiện hoạt tính như trình tự khởi đầu.

Thuật ngữ “p2Δ2” chỉ mảnh nucleotit có trình tự như nêu trong SEQ ID NO: 10 thể hiện hoạt tính như trình tự khởi đầu.

Mô tả trình tự:

SEQ ID NO: 1 là trình tự nucleotit dài 1956bp của trình tự khởi đầu cơ định của cây (“p2”) từ bông.

TGACCAACTTTCCCCTAAGGTACGAGACTTTCTAAAGTCTCTCATTTCCAGACCCTCT
AAAGCCAATTTTGACCTATTGCTTTGACTCTTCATTTTTCTTGAAATACTAATGTCTG
ATACACTCATGTCTAATATAGGTATAGGGATATAACCTTCCGAGAATCCTCCAAATAT
ATAGGAAAATATAGAAAAAAATTTGAACATCCCCTTGTCTAGATACTATGCTCCTTGGA
CCTGGGTGTAGTGTAGTGTAAAGGTATGGGTATAGTTAGATATTTCTTTTAAGTTTTTT
CATGTATTTGGAGAATCTTTTGATGTCAGATATCCATATCCATGTCTCAGACACAAGT
GGTGAACATGGTATTTCAACAAAAATGAAGTGTGCAACAACATTGGTCGGATATATA
TTGGTATCTGACACTCATGGATGAGTTAGAGTTGACATGTTTTAAAGATTATGGGTTT
CACATTACAGACGGAGCTTTGCTCTCTTTCTTGTTGATGCTAAATTGGTATTGTGG
TTATTGCGCTAAAGTTAAGATGGTCGGTTTGAATGATGTACAGGCATGTGATATTAAA
GACCCAAAGCAAAACATAGAGTGGACAGTGCCAGAAGGAGGAGGTGGCCCAGGCTATT
CAGTCATGTAGAATATATAAGCTAATCCCCTTTCTTATCATTGCTCGTTGCAAATATA
GTTCTACTTTTGTACTTTACAACAAATACATTATCTTTGAAATAATTGGTAAGTCCCA
TCTTAATTGCTACAAAATTTAACTTTTTACTATAACCAAATGAAAAGAAAGCTTTAAG
GAGTTCATGAAAGTTCATAATCTTGAGTCTTACCCCTGGATTTGCCTTCAATCTCAAG
TAATCAAGGTTTTCCATTTAAATAACTGATTGTTAACGAGTCAATATGACATAGAAG
TCTAGCTAGTTTCTCAAGGCAATCCAGAATGGTAAGCAGCTGTTAGAAATGTTTCGAA
TCAAGCGGTGGCCTCCAACAGGACTAAGGTTAAAGGTTTATACCAGAAAACCTCAAAA
TCCAACATCCTCCCTCTTATCTGCGGATTGTGGATAAAGATGGGTACCTGCTCTACG
CTATTTTATTGATGAATATACTTTGTTTTCTTCTGCTTTTATGTTAATCATAGTTGTT
TACTTTGTTAGTGAATAAACTGGTTATCATGCAGAGGAACAAAAAAGAAAAGGATAAT
TATATAGCTGAAACCTAATGACGTGTAGTCTGTTAATAGACCACTAATAATTAATATT
TTCAATCTTTGATAACATCAAATAAAAATACCATTTATTCCTTATCTATAAAAAAGGA
CACATTATCATTATCACTTACATGTGAAATTATAATAAACTTTTTTACGTAATATTTT

AGCAAATCTTACAGCATTTTTGATTGGATTTATTTAAGTATGGTATATATTAATAAAT
 ATTTAACCGATAATTATAAAATTTTAAATATTAATTTACTTTAAATTTGACATGTATT
 ATCTATATTAATGTACCATAAAATAGGATGCTAAAATATTAATAGTATAAATTATAAA
 GCGTATTTTACATCAATATAACTAGATATTTACTTAAATAATTATTTGATTAAAATTT
 AACACGTATCCATTATATATGGTCATAATTGTAGAAAGAATAAATAACCATTTGCAAT
 TGAATATTGCAAAAGATGATTGAAAATGTATGTGGTGT CATAGTGATGAGATACGTTG
 ATAATGGGATTGGATTAGGACATCCAAAAGAAAAGCTTCTTTGATTTGCCACAAGTTC
 ACATCCCGTGAGACTACAGTTTGGTTGAACAATAATCTCAACACCCGACAGGACCCAA
 AGCAAATTCAGGGTTCACGGACTACTCTCCACCAAACCTTTTCTCCATTCATTCCTCTA
 TAAATAACAATCTCTGGGTAGCTTGCCACATCATAAAAAAAGT

SEQ ID NO: 2 là đoạn môi xuôi với vị trí PstI và vị trí CACC để tạo ra SEQ ID NO: 1.

CACCTGCAGTGACCAACTTTCCCCTAAGGTACGAGACTT

SEQ ID NO: 3 là đoạn môi ngược với vị trí SacI để tạo ra SEQ ID NO: 1.

GAGCTCACTTTTTTTTATGATGTGGCAAGCTACCCAG

SEQ ID NO: 5 là trình tự nucleotit của motif CARGNCAT được xác định trong trình tự khởi đầu p2.

CCATAAAATAGG

Trình tự nucleotit của motif CARGCW8GAT được xác định trong trình tự khởi đầu p2.

ATAAAATAG

SEQ ID NO: 7 là trình tự nucleotit của motif CIACADIANLELHC được xác định trong trình tự khởi đầu p2.

CAAGGCAATC

SEQ ID NO: 8 là trình tự nucleotit của motif PRECONSCRHSP70A được xác định trong trình tự khởi đầu p2.

CCGATAATTATAAAATTTTAAATA

SEQ ID NO: 9 là mảnh khuyết p2Δ1 của trình tự khởi đầu p2.

TCCCGTGAGACTACAGTTTGGTTGAACAATAATCTCAACACCCGACAGGACCCAAAGC
 AAATTCAGGGTTCACGGACTACTCTCCACCAAACCTTTTCTCCATTCATTCCTCTATAA
 ATAACAATCTCTGGGTAGCTTGCCACATCATAAAAAAAGT

SEQ ID NO: 10 là mảnh khuyết p2Δ2 của trình tự khởi đầu p2.

TGGTTATCATGCAGAGGAACAAAAAGAAAAGGATAATTATATAGCTGAAACCTAATG
 ACGTGTAGTCTGTTAATAGACCACTAATAATTAATATTTTCAATCTTTGATAACATCA
 AATAAAAATACCATTTATTCTTATCTATAAAAAAGGACACATTATCATTATCACTTA
 CATGTGAAATTATAATAAACTTTTTTACGTAATATTTTAGCAAATCTTACAGCATTTT
 TGATTGGATTTATTTAAGTATGGTATATATTAATAAATATTTAACCGATAATTATAAA
 ATTTTAAATATTAATTTACTTTAAATTTGACATGTATTATCTATATTAATGTACCATA
 AAATAGGATGCTAAAATATTAATAGTATAAATTATAAAGCGTATTTTACATCAATATA
 ACTAGATATTTACTTAAATAATTATTTGATTAAAATTTAACAACGTATCCATTATATA
 TGGTCATAATTGTAGAAAGAATAAATAACCATTTGCAATTGAATATTGCAAAAGATGAT
 TGAAAATGTATGTGGTGTCTAGTGATGAGATACGTTGATAATGGGATTGGATTAGGA
 CATCCAAAAGAAAAGCTTCTTTGATTTGCCACAAGTTCACATCCCGTGAGACTACAGT
 TTGGTTGAACAATAATCTCAACACCCGACAGGACCCAAAGCAAATTCAGGGTTCACGG
 ACTACTCTCCACCAAACCTTTTCTCCATTCATTCCTCTATAAATAACAATCTCTGGGTA
 GCTTGCCACATCATAAAAAAAGT

SEQ ID NO: 11 là trình tự đoạn môi xuôi để khuếch đại SEQ ID NO: 9.
 TCCCGTGAGACTACAGTTTGG

SEQ ID NO: 12 là trình tự đoạn môi ngược để khuếch đại SEQ ID NO: 9 hoặc
 SEQ ID NO: 10.

GGTAGCTTGCCACATCATAAAAAAAGT

SEQ ID NO: 13 là trình tự đoạn môi xuôi để khuếch đại SEQ ID NO: 10.
 TGGTTATCATGCAGAGGAA

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ

ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa

trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO:

1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, trình tự khởi đầu này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, trình tự khởi đầu này chứa mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, trình tự khởi đầu này chứa mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kế bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1. trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, trình tự khởi đầu này chứa mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kế bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, trình tự khởi đầu này chứa mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kế bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN bao gồm

trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, trình tự khởi đầu này chứa mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao

gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên

kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm: mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm: mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao

gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này có nguồn gốc vi khuẩn.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này là *Agrobacterium tumefaciens*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này là *E.coli*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này có nguồn gốc từ nấm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này có nguồn gốc thực vật.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp là tế bào của cây một lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này là tế bào của cây hai lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp bao gồm cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào chủ tái tổ hợp này là lúa gạo.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN chứa cấu trúc ADN, cấu trúc ADN này bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này

là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào tái tổ hợp này có nguồn gốc vi khuẩn.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào tái tổ hợp này là tế bào *E.coli*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào tái tổ hợp này là tế bào *Agrobacterium tumefaciens*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp chứa vectơ ADN như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó tế bào tái tổ hợp này có nguồn gốc từ nấm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liền kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liền kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình

tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, bao gồm trong bộ gen của nó, cấu trúc ADN bao gồm trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1, trong đó mảnh ADN này được liên kết có điều khiển với trình tự axit nucleic khác loại.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định hoặc cảm ứng với áp lực, bao gồm: (a) mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó; hoặc (b) mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1; hoặc (c) mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có độ

tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% so với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cơ định, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt, có khả năng biểu hiện gen quan tâm được điều khiển khác loại bằng trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển hoặc điều hòa sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển theo cách cảm ứng áp lực, bao gồm mảnh ADN có khả năng lai hóa trong điều kiện nghiêm ngặt với đoạn liên kề bất kỳ của trình tự ADN như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó áp lực này là áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ

phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó cây chuyển gen này hoặc bộ phận của chúng, bao gồm hạt là cây một lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó cây chuyển gen này hoặc bộ phận của chúng, bao gồm hạt là cây hai lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó cây chuyển gen này hoặc bộ phận của chúng, bao gồm hạt là lúa gạo.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cây chuyển gen hoặc bộ phận của nó, bao gồm hạt như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó cây chuyển gen này hoặc bộ phận của chúng, bao gồm hạt là *Arabidopsis thaliana*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm các bước: (a) thu được (các) tế bào cây; (b) thu được cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này; hoặc tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này; (c) biến nạp (các) tế bào cây này với cấu trúc ADN này; hoặc tế bào chủ tái tổ hợp này; và (d) lựa chọn (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện gen quan tâm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm các bước: (a) thu được (các) tế bào cây; (b) thu được cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này; (c) biến nạp (các) tế bào cây này với cấu trúc ADN này và (d) lựa chọn (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện gen quan tâm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) thu được (các) tế bào cây; (b) thu được tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này; (c) biến nạp (các) tế bào cây này với tế bào chủ tái tổ hợp này; và (d) lựa chọn (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện gen quan tâm này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) tế bào cây này là cây một lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) tế bào cây này là cây hai lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) tế bào cây này là lúa gạo.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này là đặc hiệu rễ.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này là cơ định.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa để đáp ứng với áp lực muối hoặc nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa để đáp ứng với áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa để đáp ứng với áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa để đáp ứng với áp lực muối và nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biến nạp được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, phương pháp súng bắn hạt, phương pháp biến nạp *in-planta*, phương pháp biến nạp qua trung gian liposom, phương pháp biến nạp tế bào trần, phương pháp vi tiêm, và phương pháp vĩ tiêm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây chuyển gen như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biến nạp là biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm các bước: (a) thu được cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này; hoặc tế bào chủ tái tổ hợp như được mô tả trong bản mô tả này; (b) biến nạp (các) tế bào cây với cấu trúc ADN này, hoặc tế bào chủ tái tổ hợp này để thu được (các) tế bào cây biến nạp; và (c) chọn lựa (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện khác loại gen quan tâm này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm các bước: (a) thu được cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này; (b) biến nạp (các) tế bào cây với cấu trúc ADN này; và (c) chọn lựa (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện khác loại gen quan tâm này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, phương pháp này bao gồm các bước: (a) tế bào chủ tái tổ hợp như được mô tả trong bản mô tả này; (b) biến nạp (các) tế bào cây với tế bào chủ tái tổ hợp này để thu được (các) tế bào cây biến nạp; và (c) chọn lựa (các) tế bào cây biến nạp biểu hiện khác loại gen quan tâm này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) tế bào cây này là tế bào cây một lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) tế bào cây này là cây hai lá mầm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó (các) tế bào cây này là lúa gạo.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 9.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự trình tự khởi đầu này là như nêu trong SEQ ID NO: 10.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này là cơ định.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa bằng áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa bằng áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biểu hiện gen quan tâm này được điều hòa bằng áp lực nước và muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó sự biến nạp này được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, phương pháp súng bắn hạt, phương pháp biến nạp *in-planta*, phương pháp biến nạp qua trung gian liposom, phương pháp biến nạp tế bào trần, phương pháp vi tiêm, và phương pháp vĩ tiêm.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó phương pháp biến nạp là phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự khởi đầu này hữu dụng trong biểu hiện khác loại gen quan tâm trong cây chuyển gen theo cách cơ định.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự khởi đầu này hữu dụng trong biểu hiện khác loại gen quan tâm trong cây chuyển gen để đáp ứng với áp lực muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự khởi đầu này hữu dụng trong biểu hiện khác loại gen quan tâm trong cây chuyển gen để đáp ứng với áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này, trong đó trình tự khởi đầu này hữu dụng trong biểu hiện khác loại gen quan tâm trong cây chuyển gen để đáp ứng với áp lực nước và muối.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được

mô tả trong bản mô tả này, trong đó hoạt tính trình tự khởi đầu này đặc hiệu để đáp ứng với áp lực nước.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến trình tự khởi đầu như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc tạo ra cây chuyển gen biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến cấu trúc ADN như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc tạo ra cây chuyển gen biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến vector ADN như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc tạo ra cây chuyển gen biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu này.

Theo một phương án của sáng chế, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tái tổ hợp như được mô tả trong bản mô tả này để sử dụng trong việc tạo ra cây chuyển gen biểu hiện khác loại gen quan tâm được điều khiển bởi trình tự khởi đầu này.

[00218] Mặc dù đối tượng được mô tả theo cách tương đối chi tiết trong các phương án ưu tiên của chúng, nhưng các phương án khác cũng có thể được bao gồm trong sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa bằng các ví dụ thực hiện, được dự định để minh họa việc thực hiện sáng chế và không được dự định để ngụ ý giới hạn bất kỳ phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Vật liệu cây và điều kiện tăng trưởng

Giống lúa dòng bố mẹ Mahyco cụ thể là IR 58025 B được sử dụng và hạt được bảo quản ở 28°C. Nó là dòng IIRI và có bán công khai trên thị trường từ 1990. Sáng chế cũng có thể được thực hiện với giống lúa khác có bán rộng rãi trên thị trường.

Arabidopsis thaliana, Kiểu sinh thái: các hạt Columbia (col-0) được sử dụng để tạo ra cây. Hạt được bảo quản ở 25°C. Hạt thu được theo nhóm và nguồn gốc địa lý của hạt là ở Mỹ/Columbia.

Ví dụ 2: Phân lập ADN

Trình tự bộ mẫu dò *Gossypium hirsutum* ID Ghi.10553, l.Sl_s_atgblDN760229 thu được từ thử nghiệm PLEXdb (cơ sở dữ liệu biểu hiện ở thực vật PLEXdb) trong tra cứu gen được cảm ứng bởi áp lực để phân lập trình tự khởi đầu. Trình tự mRNA dự đoán và trình tự khởi đầu giả định của ngân hàng gen nêu trên ID gblDN760229 được lấy từ cottongen.org/gb/gbrowse/JGI_22 l_Dgenome và www.cottongen.org/data/download/genome_JGI through CLC Genomics Workbench.

Vùng không dịch mã 5' (UTR) được phân lập từ gen LTP (Lipid-transfer protein – protein chuyển lipid)/SSP (protein dự trữ trong hạt- p) *Gossypium hirsutum* được mã hóa là p2 (SEQ ID NO: 1). Đoạn mỗi xuôi có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO: 2 và đoạn mỗi ngược có trình tự nucleotit như nêu trong SEQ ID NO: 3 được thiết kế để khuếch đại trình tự khởi đầu p2 từ bông. Điều kiện PCR được sử dụng để khuếch đại được nêu trong bảng 1,

Bảng 1

Bước PCR	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Số chu kỳ
Biến tính ban đầu	95	300	1
Biến tính	94	30	35
Ghép	55	30	
Kéo dài	72	120	
Kéo dài cuối cùng	72	600	

Ví dụ 3: Tạo cấu trúc vector để biến nạp ở cây

Kỹ thuật tách dòng Gateway để tách dòng định hướng được sử dụng để tách dòng trình tự khởi đầu p2, Vector cho pENTR™/D-TOPO do invitrogen™ cung cấp được sử dụng để thu được dòng tiếp nhận trình tự khởi đầu p2, (Số Catalog: K2400-20 pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, với E. coli có khả năng biến đổi hóa học One Shot® TOP 10).

Sản phẩm PCR được khuếch đại (SEQ ID NO: 1. 9 hoặc 10) được tách dòng trong vector gateway cho PENTR/ D-TOPO và được tái tổ hợp trong vector biểu hiện gateway pMDC164,

Điều kiện phản ứng tách dòng TOPO® được sử dụng được nêu dưới đây:

p2 PCR rửa giải: 2µl (20ng/µl)

Dung dịch muối: 0,5 μ l

pENTR/D-TOPO: 0,5 μ l (15-20 ng/ μ l plasmit được duỗi thẳng)

Tổng: 3 μ l

Quá trình biến nạp trong tế bào E. Coli có khả năng biến đổi hóa học Top 10 one shot® được thực hiện theo hướng dẫn người sử dụng.

Phản ứng tái tổ hợp LR được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tiếp nhận pENTR p2 và vector nhận/biểu hiện gateway pMDC164. (nguồn pMDC 164: ABRC-abrc.osu.edu và Số Catalog: 11791-020 cho hỗn hợp Gateway® LR Clonaza® II Enzym).

Phản ứng tái tổ hợp LR:

pENTR p2: 1 μ l (50ng/ μ l)

LR clonaza : 1 μ l

PMDC 164: 1.5 μ l (350 ng/ μ l)

Tổng: 3,5 μ l

Vector biểu hiện pMDC p2 (Fig. 1), pMDCp2A1 (Fig. 5 A), hoặc pMDCp2A2 (Fig. 5B) được lấy từ *Agrobacterium* chủng EHA 105 (sẵn có theo nhóm) bằng cách sử dụng phương pháp đông lạnh rồi đông để biến nạp ở cây. Trong mỗi trường hợp, khoảng 1 μ g plasmit được bổ sung vào 100 μ l tế bào khả biến EHA105. Sau đó, tế bào được làm đông lạnh trong ni tơ lỏng trong 5 phút và được rã đông ở 37°C trong 10 phút. 1ml môi trường LB broth được bổ sung và được ủ trong thời gian từ 2 đến 4 giờ ở 28°C. Sau đó, khoảng 200 μ l chất cấy vi khuẩn được trải trên đĩa chọn lọc được làm ấm trước và được ủ ở 28°C trong 2 ngày.

Ví dụ 4: Biến nạp vào *Agrobacterium*

Biến nạp *Arabidopsis*: Biến nạp thông qua *Agrobacterium* của *Arabidopsis thaliana* (Columbia-0) được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp nhúng chìm hoa như được mô tả trong Das et al., 2011 với cải biến nhỏ (Das et al., 2011, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 59-67).

Trồng cây *Arabidopsis*: hạt *Arabidopsis* được giữ trong 3 ngày ở 4°C để phá vỡ trạng thái ngủ. Hạt đã xuân hóa được xếp lớp trên soilrite, trong cốc chất dẻo. Các cốc

này được tưới nước định kỳ và được ủ trong buồng sinh trưởng hoặc trong phòng nuôi cấy ở 25°C trong điều kiện 16 giờ sáng / 8 giờ tối đến khi giai đoạn phát hoa hoặc hoa đến. Các phát hoa sơ cấp được cắt để thu được chồi thứ cấp.

Chuẩn bị nuôi cấy *Agrobacterium*: hai ngày trước khi chuẩn bị bắt đầu nuôi cấy, *Agrobacterium* chủng EHA 105 mang pMDC164 p2-GUS sử dụng trong phương pháp nhúng chìm hoa được cấy vạch trên thạch LB chứa chọn lọc kháng sinh và được ủ ở 28°C (cloramphenicol 10mg/l và kanamycin 50mg/l). Ngay trước khi nhúng chìm hoa, chất cấy *Agrobacterium* được nuôi được lấy khỏi đĩa, được tạo huyền phù trong môi trường chất để chủng 3 và - 1,0 OD ở 600nm (pha tĩnh) được sử dụng để gây nhiễm.

Nhúng chìm hoa: cây ở giai đoạn nảy chồi được lấy và được nhúng vào trong chất cấy *Agrobacterium* bằng cách đảo ngược trong thời gian từ 40 đến 50 giây và lắc giữa mỗi lần đảo. Sau khi nhúng chìm hoa, cây được giữ thẳng đứng trong khay được đậy bằng túi polyten qua đêm ở 25°C trong tối. Ngày tiếp theo, cây đã bị nhiễm được giữ ở tư thế đứng thẳng và được ủ ở 25°C trong 16 giờ sáng /8 giờ tối trong phòng nuôi cấy cho đến khi thu hoạch hạt.

Sàng lọc thể biến nạp dương tính: hạt *Arabidopsis* T₀ được giữ trong 3 ngày ở nhiệt độ 4°C để phá vỡ trạng thái ngủ. Hạt đã xuân hóa được khử trùng bằng 1,5% natri hypoclorit trong 1 phút sau đó được rửa bằng D/W trong 5 lần và được xếp lớp trên 0,5X MS không chứa sucroza và chứa 10mg/l Hygromycin, được ủ ở 25°C trong 16 giờ sáng /8 giờ tối trong phòng nuôi cấy.

Hiệu quả biến nạp bằng khoảng 1% (không tập trung vào hiệu quả biến nạp)

Thành phần môi trường được sử dụng được nêu dưới đây:

Chất để chủng 3 – muối MS: 0,5X, vitamin B5: IX, Glucoza :5%, BAP: 0,004M, Tween-20: 0,075% độ pH 5,7; 2] môi trường LB -10g trypton, 5g chất chiết nấm men, 10g NaCl trong mỗi lit, Thạch: 0,8% độ pH 7,0,

Biến nạp ở lúa gạo: Phương pháp biến nạp ở lúa gạo qua trung gian *Agrobacterium* được thực hiện bằng phương pháp như được mô tả trong tài liệu của Hiei et al, 2006, Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Quá trình biến nạp được thực hiện bằng cách biến đổi đôi chút phương pháp này. Để biến nạp ở lúa gạo qua trung gian *Agrobacterium* dòng bố mẹ Mahyco PMS34-25B được sử dụng.

Phôi chưa trưởng thành mới được phân lập từ cây được trồng trong nhà kính, sau từ 10 đến 12 ngày sau khi nở hoa được ủ với *A. tumefaciens* EHA105 pMDC164 p2, Ba ngày trước khi gây nhiễm *Agrobacterium* chủng EHA 105 mang pMDC164 p2::GUS được cấy vạch trên thạch LB chứa kháng sinh chọn lọc và được ủ ở 28°C (Cloramphenicol 10mg/l và Kanamycin 50mg/l). Ngay trước khi nhiễm chất cây *Agrobacterium* đã sinh trưởng được lấy khỏi đĩa, được tạo huyền phù trong môi trường nhiễm AA và – 1,0 OD ở 600nm (pha ổn định) được sử dụng để lây nhiễm.

Khử trùng hạt: Hạt được tách vỏ bằng tay và được khử trùng trong etanol 70% trong 30 giây và trong dung dịch natri hypoclorit 1,5% trong 5 phút. Hạt chưa trưởng thành được rửa vài lần trong nước tiệt trùng, và phôi chưa trưởng thành có chiều dài từ 1,0 đến 1,5mm được thu gom dưới kính hiển vi vi phẫu lập thể. 5µl chất cấy *Agrobacterium* được tạo huyền phù được nhỏ giọt lên trên thuận của phôi chưa trưởng thành mới được phân lập được ủ trong 15 phút sau đó được nuôi cấy đồng thời trên môi trường NBAs trong thời gian từ 4 đến 6 ngày trong tối ở 25°C.

Bước nghỉ: Sau khi nuôi cấy đồng thời, các chồi đã kéo dài được lấy ra khỏi phôi chưa trưởng thành bằng dao mổ và phôi chưa trưởng thành được nuôi cấy trên môi trường NBM chứa 250 mg/l xefotaxim và 100 mg/l carbenixilin với mặt thuận trong 5 ngày.

Bước chọn lọc: Sau bước nghỉ phôi chưa trưởng thành được chuyển sang môi trường chọn lọc NBM chứa 250 mg/l xefotaxim và 50 mg 1/L hygromycin trong 2 tuần sau đó chọn lọc lần hai trong hai tuần trên NBM mới chứa môi trường 250 mg/l xefotaxim và 50 mg/l hygromycin.

Bước trước tái sinh: Mô sẹo chắc chắn kháng hygromycin thu được từ thuận được chuyển sang môi trường trước tái sinh NBPR chứa 40 mg/l hygromycin và 250 mg/l và xefotaxim được nuôi cấy trong 10 ngày.

Bước tái sinh: Mô sẹo tăng sinh nhanh chóng với các điểm màu xanh lá cây được nuôi cấy trên môi trường tái sinh RNM chứa 30 mg/l hygromycin và 250 mg/l xefotaxim.

Tạo rễ: Cây non được tái sinh được nuôi cấy trên môi trường tạo rễ MSN 1,5 chứa 30 mg/l hygromycin.

Trong tất cả các bước sau đây, chất cấy được ủ ở 28°C dưới 16 giờ sáng và 8 giờ tối. Cây cứng cáp trong chậu đất và được tăng trưởng đến trưởng thành trong nhà kính.

Các thành phần của môi trường

Môi trường gây nhiễm AA: muối AA và axit amin (Toriyama và Hinata, 1985), vitamin B5, 0,5 g/l, axit casamino loại bỏ vitamin (Vitamin Assay Casamino Acids), 20g/l sucroza, 10 g/l D-Glucoza, 0,1 mM axetosyringon, pH 5,2.

NBM: Muối chính N6, muối phụ B5 và vitamin, 0,5 g/l axit casamino loại bỏ vitamin, 0,5 g/l L-prolin, 0,3 g/l L-glutamin, 20 g/l D-maltoza, 36 g/l D-mannitol, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, 0,2 mg /l BA, 5 g/l Gelrite, pH 5,8.

NBPR: Muối chính N6, muối phụ B5 và vitamin, 0,5 g/l axit casamino loại bỏ vitamin, 0,5 g/l L-prolin, 0,3 g/l L-glutamin, 30 g/l D-maltoza, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l 1 NAA, 1 mg/l BA, 7 g/l Gelrite, pH 5,8.

RNM: Muối chính N6, muối phụ B5 và vitamin, 0,3 g /L axit casamino loại bỏ vitamin, 0,3 g /L L-prolin, 0,3 g /L L-glutamin, 30 g /L D-maltoza, 1 mg /L NAA, 3 mg /L BA, 4 g /L agarosa Typ I, pH 5,8.

MSN 1,5: Nồng độ 100% của muối chính MS, muối phụ MS, vitamin MS và 100mg/l myo-inocitol , MS CaCl₂ , MS iron, (Murashige và Skoog, 1962), 30g /L sucroza, 1,5mg/l NAA , 3g/ L phytagel , pH 5,8.

Tám cây độc lập được tái sinh và ba cây được chọn để phân tích. Hiệu quả biến nạp là 30%.

Biến nạp ở cây bông:

Cây bông được dùng để biến nạp Coker 310FR ((*Gossypium hirsutum*). Quá trình biến nạp ở bông: Biến nạp ở cây bông qua trung gian *Agrobacterium* được thực hiện bằng phương pháp như phương pháp được Chaudhary et al. 2003 và Kumar et al. 1998 mô tả với một số biến đổi.

Khử trùng bề mặt hạt: hạt trưởng thành đã loại bỏ tủa lông được khử trùng bằng etanol 100% trong 2 phút sau đó xử lý bằng thủy ngân clorua 0,1% trong 5 phút.

Ủ hạt: Hạt trưởng thành được khử trùng bề mặt được che kín và được ủ trên môi trường nuôi cấy SIM trong chai và được ủ ở 28°C trong ba đêm trong 5 ngày.

Môi trường nuôi cấy SIM: muối MS và vitamin, 3% sucroza, pH 5,8. 0,8% thạch.

Chuẩn bị chất cấy *Agrobacterium*: *Agrobacterium* chủng EHA105 pMDCp2 được cấy vạch từ dung dịch gốc glyxerol trên môi trường LB rắn được bổ sung 10mg/l Cloramphenicol và 50mg/l kanamixin và được nuôi trong 48 giờ ở 28°C. Thể huyền phù được chuẩn bị trong môi trường LB lỏng được bổ sung 10mg/l Cloramphenicol và 50mg/l kanamixine và được nuôi qua đêm ở 28°C. Giá trị O.D. thu được (khoảng 2,0 ở chiều dài bước sóng 600nm) được pha loãng 20 lần trong môi trường nuôi cấy CTM1 lỏng (sao cho O.D. cuối cùng đạt giá trị khoảng 0,1). Thể huyền phù *Agrobacterium* đã pha loãng được sử dụng để biến nạp.

Lây nhiễm:

Đoạn trụ dưới lá mầm dài 0,5cm từ cây giống con 5 ngày tuổi được sử dụng làm mảnh cấy để lây nhiễm. Mảnh cấy được ngâm trong thể huyền phù *Agrobacterium* trong 20 phút, được che kín và được nuôi cấy đồng thời trong 3 ngày ở 22°C trên môi trường nuôi cấy CTM1 được bổ sung 100µM axetosyringon và được đậy bằng lớp giấy lọc Whatman #1 để làm giảm sự phát triển quá mức của *Agrobacterium*.

Sau khi nuôi cấy đồng thời mảnh cấy được rửa trong môi trường nuôi cấy CTM1 lỏng được bổ sung 250mg/l carbenixilin, được che kín và được chuyển 5 mảnh cấy trong mỗi đĩa petri thủy tinh chứa 70-80ml môi trường nuôi cấy CTM1 được bổ sung 10mg/l hygromyxin và 250mg/l augmentin, MES 500mg/l. Các mảnh cấy được ủ trong thời gian từ 5 đến 6 tuần ở 28°C trong một đèn ống.

Mô sẹo dễ vỡ từ 3 mảnh cấy riêng rẽ được phủ trong mỗi đĩa petri thủy tinh chứa 70-80ml môi trường nuôi cấy CTM2 được bổ sung 7,5mg/l hygromyxin và 100mg/l augmentin. Mô sẹo được ủ ở 28°C trong một đèn ống trong 7 đến 8 tuần

Mô sẹo sinh phôi đã phát triển tốt được nuôi cấy chuyển trên 50ml môi trường nuôi cấy CTM2 được bổ sung 7,5mg/l hygromyxin và 250mg/l carbenixilin, được ủ trong 2 tuần ở 28°C trong một đèn ống.

Việc cấy chuyển thường xuyên mô sẹo sinh phôi (mỗi lần 15 ngày) trên 50ml môi trường nuôi cấy CTM3 được ủ ở 28°C trong ba đèn ống, các đĩa nuôi cấy chuyển cuối cùng sẽ được duy trì trong 15 ngày nữa để dự trữ và cũng chọn các phôi đã dài ra. Các

phôi cũng được nuôi cấy chuyển trên môi trường tương tự (các phôi nảy mầm sang môi trường nuôi cấy rắn MSB nồng độ $\frac{1}{2}$).

Môi trường nuôi cấy:

CTM1 (lỏng): Muối MS và vitamin B₅, Glucoza 3% (trọng lượng/thể tích), 0,1mg/l 2,4 D(sigma) và 0,5mg/l kinetin (Sigma), pH 5,9 (trong môi trường này glucoza không được tiệt trùng bằng cách lọc).

CTM1: Muối MS và vitamin B₅, Glucoza 3% (trọng lượng/thể tích), 0,1mg/l 2,4 D(sigma) và 0,5mg/l kinetin (Sigma), 0,2% phytigel (Sigma), pH 5,9,

CTM2: Muối MS và vitamin B₅, Glucoza 3% (trọng lượng/thể tích), 0,2% phytigel (Sigma), pH 5,9,

CTM3: Muối MS (1,9g/l KNO₃ bổ sung) và vitamin B₅, glucoza 3% (trọng lượng/thể tích), 0,2% phytigel (Sigma), pH 5,9,

MSB nồng độ $\frac{1}{2}$ (rắn): Muối MS nồng độ $\frac{1}{2}$, vitamin B₅, sucroza 1,5% (trọng lượng/thể tích), pH 5,9, 0,2% (trọng lượng/thể tích) phytigel (sigma),

MSB nồng độ $\frac{1}{2}$ (lỏng): Muối MS nồng độ $\frac{1}{2}$, vitamin B₅, sucroza 1,5% (trọng lượng/thể tích), pH 5,9.

Trong các môi trường nuôi cấy CTM1, CTM2 và CTM3, thể tích cuối cùng là 11 môi trường nuôi cấy không chứa glucoza được điều chỉnh đến 880ml và được hấp thanh trùng. Glucoza (30g) được hòa tan trong 100ml nước cất, sao cho thể tích cuối cùng đạt đến 120ml được lọc khử trùng và được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ảm được hấp thanh trùng.

Bất kỳ khi nào augmentin được sử dụng trong môi trường nuôi cấy, nó được trộn trong nồng độ yêu cầu với dung dịch glucoza, độ pH được điều chỉnh đến 5,9, nó được lọc khử trùng và sau đó được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ảm được hấp thanh trùng.

Từ biến nạp trên cây bông một cây bông độc lập được tạo ra và được chọn lọc. Rất ít mảnh cây được sử dụng để biến nạp.

Ví dụ 5: Thử nghiệm GUS

Sự biểu hiện GUS ổn định của trình tự khởi đầu p2 (SEQ ID NO: 1) được thực

hiện ở lúa gạo và bông. Mô được cho vào chất đệm GUS qua đêm sau đó được tẩy trắng trong rượu và kiểm tra sự biểu hiện.

Chế phẩm đệm GUS cho 100ml được nêu dưới đây;

Chất đệm kali phosphat (0,2M): 50ml

Triton X-100 (0,1%): 10ml

Kali ferixyanua (50mM): 2ml

Kali feroxyanua (50mM): 2ml

Metanol: 20ml

X-Gluc (50mg/ml): 1ml

D/W: 15ml

Fig. 2 là ảnh thể hiện sự biểu hiện GUS được điều khiển bởi trình tự khởi đầu p2 ở lúa gạo và bông. Như được thể hiện trong Fig. 2, sự biểu hiện GUS ổn định về mặt chất lượng ở cây lúa p2 pMDC p2-4 và pMDC p2-8 có thể quan sát được ở các mô khác nhau như lá, rễ, hạt, mày dưới và lá bắc trên ở lúa gạo. Ở bông, sự biểu hiện GUS ổn định ở cây bông p2 CT/pMDC p2-1B có thể quan sát được ở mô lá và mô rễ.

Fig. 3 là ảnh thể hiện sự biểu hiện GUS hóa mô ổn định về chất lượng ở cây T1 p2 Arabidopsis pMDC p2-1-1, quan sát được sự biểu hiện cụ thể là trong rễ mạnh hơn so với mô lá và mô thân. Fig. 8 thể hiện sự biểu hiện GUS ở cây T3,

Như được thể hiện trong Fig. 2, Fig. 3, và Fig. 8, có thể suy ra rằng trình tự khởi đầu p2 (SEQ ID NO: 1) điều khiển biểu hiện của GUS theo cách cơ định và không đặc hiệu mô, mặc dù sự biểu hiện trong rễ dường như là cao hơn trong các mô khác. Sự định lượng về hoạt tính GUS được thực hiện bằng thử nghiệm huỳnh quang được mô tả trong Jefferson et al., 1987 (Jefferson et al., 1987, EMBO J., 6, 3901-3907) và Gallagher, 1992 (Gallagher, S.R. (1992) Academic Press, Inc., New York, pp. 47-59).

Chất chiết mô cây: 100mg mô lá được nghiền trong 200 μ l chất đệm chiết trong ống vi ly tâm. Sau đó, mô lá được ly tâm ở tốc độ 12000vòng/phút trong 15 phút ở 40°C để loại bỏ vụn tế bào. Dịch nổi được chuyển sang ống mới.

Thử nghiệm MUG: 20 μ l chất đồng nhất (khoảng μ g protein) được trộn với 80 μ l chất đệm thử nghiệm GUS. Hỗn hợp được cuộn xoáy và được ủ ở 37°C trong 30 phút

và 60 phút trong bồn nước. 2 μ l mỗi hỗn hợp phản ứng và của mỗi chất chuẩn MU được trộn với 475 μ l chất đệm ngừng phản ứng. 200 μ l trong hỗn hợp thu được từ bước trên được nạp theo cách lặp lại hai lần trong đĩa vi chuẩn và sự phát huỳnh quang được xác định, kích thích ở 365nm và phát xạ ở 444nm).

Tính toán hoạt tính GUS:

$$\text{pmol MU}/\mu\text{g protein/phút} = (\text{pmol MU}/\text{giếng})/0,5 \mu\text{g protein} \times \text{phút thử nghiệm}$$

Thành phần của chất đệm:

Chất đệm chiết: 50mM NaP04 pH 7,0, 10mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,1% natri lauryl sarcosin, 10mM β -mercaptoetanol. Được bảo quản ở 40°C

Chất đệm thử nghiệm GUS: 2mM chất đệm chiết MUG (10ml hỗn hợp dung dịch thử nghiệm MUG 8,8mg trong chất đệm chiết) được chuẩn bị mới ngay trước khi sử dụng.

Dung dịch gốc hiệu chỉnh MU đậm đặc: trộn 9,9 mg trong 50ml D/W để điều chế 1mM dung dịch gốc MU. Độ pha loãng 1:10 được chuẩn bị để thu được 100 μ M dung dịch gốc MU và độ pha loãng 1:50 để thu được 20 μ M dung dịch gốc.

Để lập đường cong chuẩn, các độ pha loãng sau đây được sử dụng: 0, 4, 8, 12, 20, 40, 100, 250, và 500 pmol MU.

Chất đệm ngừng phản ứng: 200mM Na₂CO₃ độ pH 11,2 (21,2 gm/L).

Thử nghiệm được thực hiện trên mô lá chuyển gen. Bảng 2 thể hiện kết quả định lượng GUS MU cây lúa gạo p2- 8A (mô lá).

Bảng 2

Số mẫu	Mẫu	Nồng độ		
		pmol/giếng	pmol MU/ μ g protein/phút	Sai số chuẩn
1	Kiểu đại	0,26184	1,7456	0,2635
2	GUS trống	3,1583	21,0553	4,57
3	p2::GUS	452,28	3015,2	120,01
4	35S::GUS	750	5000	117,87

Cùng với 2 dòng vô tính của cây p2-8 (p2-8A và p2-8B) các cây p2-4 và p2-6 từ lúa gạo và một dòng từ bông CT/pMDC p2-1B (là PCR dương tính về sự có mặt của

trình tự khởi đầu p2 và định tính hóa mô GUS dương tính) được sàng lọc về sự biểu hiện GUS định lượng.

Trong số ba cây lúa gạo p2-8 thể hiện sự biểu hiện tốt nhất và cây bông cũng thể hiện giá trị định lượng GUS gần với cây p2-8,

Giá trị định lượng theo pmol MU/ μ g protein/phút: Kiểu đại (1,7456), GUS trống (21,0553), cây lúa gạo - p2-8A (3015,2), p2-4B (185.33), p2-6B (61,97), cây bông - p2-1B (2484,5) và 35S::GUS (5000).

Fig. 4 là đồ thị của số liệu như được nêu trong bảng 2. Từ bảng 2, và Fig. 4, có thể suy ra rằng trình tự khởi đầu p2 (SEQ ID NO: 1) có thể điều khiển sự biểu hiện của GUS lên đến 60% so với mức biểu hiện GUS được điều khiển bởi trình tự khởi đầu cơ định 35S.

Ví dụ 6: Phân tích trình tự khởi đầu bằng cơ sở dữ liệu yếu tố ADN điều hòa tác động kiểu cis ở cây (PLACE)

Phân tích PLACE cung cấp thông tin về yếu tố điều hòa Cis có mặt trong trình tự khởi đầu p2. Các motif tham gia vào đáp ứng áp lực phi sinh học, vị trí gắn kết yếu tố phiên mã, tính đặc hiệu mô có mặt trong trình tự khởi đầu p2 được nghiên cứu thông qua phân tích khuyết để đạt được hoạt tính mong muốn của trình tự khởi đầu.

Phân tích mảnh trình tự khởi đầu p2 (SEQ ID NO: 1) bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu PLACE nhận biết các motif đáp ứng áp lực và đặc hiệu mô khác nhau trong trình tự trình tự khởi đầu p2, [Higo K et al., 1999, Nucleic acid Res.; 27(1):297-300; Omodele et al., 2010, Computational Biology và Chemistry 34, 268-283]. Bảng 3 dưới đây là danh sách các motif được xác định trong trình tự khởi đầu p2.

Bảng 3: Danh sách các motif xác định được trong trình tự khởi đầu p2.

Bảng 3

Số mẫu	Motif	Trình tự	Chức năng
1.	-300 ELEMENT	TGCAAAAG	Sự phân giải protein dự trữ trong hạt - biểu hiện nội nhũ
2.	ABRELATERD1	ACGTG	Tạo sự khử nước
3.	ACGTABOX	TACGTA	Gắn kết bZIP TF

Số mẫu	Motif	Trình tự	Chức năng
4.	ACGTATERD1	ACGT	Tạo sự khử nước
5.	AMYBOX2	TATCCAT	Biểu hiện alpha-amylaza Amy3D khi thiếu đường
6.	ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	Con đường lên men
7.	ARFAT	TGTCTC	Vị trí gắn kết cho yếu tố đáp ứng auxin
8.	ARR1AT	AGATT	yếu tố gắn kết ARR1 hoạt động như yếu tố hoạt hóa phiên mã
9.	ASF1MOTIFCAMV	TGACG	Yếu tố đáp ứng phòng vệ
10.	BIHD1OS	TGTCA	Yếu tố phiên mã tham gia vào đáp ứng kháng bệnh
11.	BOXIINTPATPB	ATAGAA	Khởi đầu phiên mã
12.	BOXLCOREDCPAL	ACCTTCC	Chất hoạt hóa phiên mã của gen phenylalanin ammoniac lyaza
13.	CAATBOX1	CAAT	Tạo tính đặc hiệu mô
14.	CACTFTPPCA1	TACT,CACT	Sự biểu hiện của gen đặc hiệu thịt lá trong cây C4
15.	CARGNCAT	SEQ ID NO: 5	Điều hòa sự biểu hiện của gen mã hóa enzym tham gia vào sự chuyển hóa gibberelin.
16.	CARGCW8GAT	SEQ ID NO: 6	Sự chọn lọc vị trí gắn kết cho protein AGL15 miền MADS của cây
17.	CCA1ATLHCB1	AACAATCT	Yếu tố phiên mã liên quan đến myb tham gia vào sự điều hòa sắc tố thực vật của gen Lhcb của Arabidopsis
18.	CCAATBOX1	CCAAT	Tạo tính đặc hiệu mô
19.	CIACADIANLELHC	SEQ ID NO: 7	Biểu hiện một lần một ngày
20.	CURECORECR	GTAC	Lõi của CuRE (yếu tố đáp ứng đồng) tham gia vào đáp ứng oxy
21.	DOFCOREZM	AAAG	Yếu tố phiên mã tham gia vào sự chuyển hóa cacbon

Số mẫu	Motif	Trình tự	Chức năng
22.	DPBFCOREDCDC3	ACACAAG/ ACACCCG	Đặc hiệu mô
23.	EBOXBNNAPA	CAAGTG/ CATGTG/CAA ATG/ CAGCTG/CACC TG/CAATTG	Đặc hiệu mô
24.	EECCRCAH1	GACTTTC/ GATTTGC/ GATTTGC	Vị trí gắn kết của yếu tố phiên mã Myb
25.	ELRECOREPCRP1	TTGACC	Yếu tố đáp ứng chất kích kháng thực vật
26.	GATABOX	GATA	Đặc hiệu mô
27.	GT1CONSENSUS	GATAAT/GAA AAT/ GATAAA/GAA AAA	dung chịu muối và tương tác phát sinh bệnh
28.	GT1CORE	GGTTAA	dung chịu muối và tương tác phát sinh bệnh
29.	GT1GMSCAM4	GAAAAA	dung chịu muối và tương tác phát sinh bệnh
30.	GTGANTG10	GTGA	Biểu hiện đặc hiệu hạt phấn
31.	HDZIP2ATATHB2	TAATAATTA	Tín hiệu yếu tố phiên mã trong sự hình thành hình dạng cây
32.	IBOXCORE	GATAA	Ngược hướng trình tự bảo toàn của gen được điều hòa bởi ánh sáng
33.	INRNTPSADB	CTCATTTTC	Yếu tố khởi đầu
34.	LECPLEACS2	TAAAATAT	Đáp ứng phòng vệ
35.	MYBST1,	TAACCA	Yếu tố đáp ứng sự khử nước
36.	MYCATERD1	CATGTG	Tạo tính đặc hiệu mô
37.	MYCCONSensusAT	CAAGTG/CAT GTG/CAGCTG	Tạo tính đặc hiệu mô
38.	NODCON1GM	AAAGAT	Đặc hiệu nốt sần

Số mẫu	Motif	Trình tự	Chức năng
39.	NODCON2GM	CTCTT	Đặc hiệu nốt sần
40.	NTBBF1ARROLB,	ACTTTA	Đặc hiệu mô
41	OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	Yếu tố đặc hiệu cơ quan
42.	P1BS	GAATATAC	Đáp ứng thiếu phosphat
43.	POLASIG1	AATAAA	Tín hiệu poly (A) đặc hiệu cây
44.	POLLEN1LELAT52,	AGAAA	hoạt hóa đặc hiệu hạt phấn
45.	PREATPRODH	ACTCAT	yếu tố đáp ứng giảm nồng độ thẩm thấu
46.	PRECONSCRHSP70A	SEQ ID NO: 8	Yếu tố đáp ứng lập thể hoạt động như trình tự tăng cường
47.	RAV1AAT	CAACA	Đặc hiệu mô
48.	RBCSCONSENSUS	AATCCAA	Biểu hiện gen mã hóa ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza
49,	ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	Đặc hiệu mô
50.	RYREPEATBNNAPA	CATGCA	Biểu hiện đặc hiệu hạt
51.	S1FBOXSORPS1L21	ATGGTA	Mã hóa protein ribosom
52.	S1FSORPL21	ATGGTATT	Mã hóa protein ribosom lập thể
53.	SEF4MOTIFGM7S	ATTTTTG	Protein dự trữ trong hạt
54.	SORLIP1AT	GCCAC	Đặc hiệu mô
55.	SURE2STPAT21	AATACTAAT	Điều khiển sự điều hòa sự chuyển hóa và phát triển của gen protein lưu trữ
56.	SURECOREATSULTR11	GAGAC	Đáp ứng thiếu hụt lưu huỳnh
57.	TAAAGSTKST1	TAAAG	Sự biểu hiện gen đặc hiệu tế bào bảo vệ
58.	TATABOX2	TATAAAT	Sự khởi đầu chính xác
59.	TATABOX3	TATTAAT	Sự khởi đầu chính xác
60.	TATABOX5	TTATTT	Sự khởi đầu chính xác
61.	TATABOXOSPAL	TATTTAA	yếu tố gắn kết ADN
62.	TATCCAOSAMY	TATCCA	Điều hòa đường và hormon

Số mẫu	Motif	Trình tự	Chức năng
63.	TATCCAYMOTIFOSRA MY3D	TATCCAT	Ức chế đường
64.	TBOXATGAPB	ACTTTG	Chất điều biến quá trình phiên mã được hoạt hóa bằng ánh sáng
65.	TGACGTVMAMY	TGACGT	Biểu hiện đặc hiệu hạt
66.	WBOXATNPR1	TTTGACC	Yếu tố phiên mã tham gia vào các áp lực từ môi trường
67.	WBOXHVIS01	TGACT	yếu tố đáp ứng sự ức chế đường
68.	WBOXNTERF3	TGACC/TGACT	Đáp ứng phòng vệ
69.	WRKY71OS	TGAC	dung chịu muối và trong tác phát sinh bệnh

Ví dụ 7: Phân tích khuyết trình tự khởi đầu p2

Để mô tả đặc điểm hoạt tính trình tự khởi đầu p2, phân tích khuyết được thực hiện. 2 cấu trúc khuyết khác nhau được tạo ra, cụ thể là, p2Δ1 (SEQ ID NO: 9), và p2Δ2 (SEQ ID NO: 10). Hai trình tự khởi đầu khuyết được tách dòng trong vector biểu hiện pMDC, thu được từ *Agrobacterium* chủng EHA 105 (EHA pMDC p2 Δ1 và EHA pMDC p2 Δ2) để biến nạp ở cây. Trình tự trình tự khởi đầu và nhanh chóng xác định được bằng cách giải trình tự.

Điều kiện PCR được sử dụng để tạo ra mảnh p2Δ1 được nêu dưới đây trong bảng 4, bộ môi xuôi và môi ngược được sử dụng để khuếch đại SEQ ID NO: 9 là như nêu trong SEQ ID NO: 11, và SEQ ID NO: 12 tương ứng.

Bảng 4

Bước PCR	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Số chu kỳ
Biến tính ban đầu	95	300	1
Biến tính	94	30	40
Ghép	51	30	
Kéo dài	72	20	
Kéo dài cuối cùng	72	600	

Điều kiện PCR được sử dụng để tạo ra mảnh p2Δ2 được nêu dưới đây trong bảng 5. Bộ môi xuôi và môi ngược được sử dụng để khuếch đại SEQ ID NO: 10 là như nêu trong SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 14 tương ứng.

Bảng 5

Bước PCR	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giây)	Số chu kỳ
Biến tính ban đầu	95	300	1
Biến tính	94	30	40
Ghép	50	30	
Kéo dài	72	60	
Kéo dài cuối cùng	72	600	

Bảng 6 dưới đây là kết quả phân tích motif điều hòa cis (PLACE) của mảnh khuyết p2Δ1.

Bảng 6

Số Sr.	Tên yếu tố hoặc vị trí	Vị trí	Trình tự tín hiệu	Chức năng
1	GTGANT G10	5 (+)	GTGA	Đặc hiệu hạt phấn
2	SURECOR EATSULT R11	7 (+)	GAGAC	Lỗi của yếu tố đáp ứng lưu huỳnh
3	CAATBO X1	27 (+)	CAAT	Trình tự chịu trách nhiệm về hoạt tính khởi đầu đặc hiệu mô của gen legumin đậu Hà lan ở thuốc lá
4	POLASIG 3	28 (+)	AATAAT	Tín hiệu polyA của cây
5	RAV1AA T	36 (+)	CAACA	Gắn kết trình tự liên ứng của yếu tố phiên mã <i>Arabidopsis</i> , RAV1/ Mức biểu hiện của RAV1 khá cao trong lá và thân hoa hồng
6	DPBFCOR EDCDC3	38 (+)	ACACNN G	Nhóm yếu tố phiên mã bZIP mới, DPBF-1 và 2 (yếu tố gắn kết trình tự khởi đầu Dc3-1 và 2) liên kết trình tự lõi; Được tìm thấy trong cà rốt (D.c.) trình tự khởi đầu Dc3; sự biểu hiện của Dc3 thường đặc hiệu phôi, và cũng có thể được cảm ứng bởi ABA

7	LTRECOR EATCOR1 5	42 (+)	CCGAC	Lỗi của yếu tố đáp ứng nhiệt độ thấp (LTRE) của gen cor15a trong <i>Arabidopsis</i> /một phần của đoạn lặp lại C (đoạn lặp lại C), TGGCCGAC, lặp lại hai lần trong trình tự khởi đầu cor15a.
8	PRECONS CRHSP70 A	42 (+)	SCGAYN RNNNNN NNNNNN NNNNHD	Trình tự liên ứng của PRE (yếu tố đáp ứng lặp thể) trong trình tự khởi đầu của HSP70A trong <i>Chlamydomonas</i> ; Tham gia vào sự cảm ứng gen HSP70A bởi MgProto và ánh sáng.
9	DOFCOR EZM	54 (+)	AAAG	Vị trí lỗi cần để gắn kết protein Dof ở ngô/bón cADNA mã hóa các protein Dof, Dof1, Dof2, Dof3 và PBF, được phân lập từ ngô; PBF là protein Dof đặc hiệu nội nhũ liên kết với hợp prolamin
10	CACTFTP PCA1	78 (+)	YACT	mô-đun biểu hiện ở thịt lá 1/ được tìm thấy trong yếu tố điều hòa cis trong vùng xa của phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppcA1) của cây hai lá mầm C4
11	MYBPLA NT	85 (+)	MACCWA MC	Vị trí gắn kết MYB của cây
12	INRNTPS ADB	102 (+)	YTCANT YY	yếu tố khởi đầu (Inr) được tìm thấy trong trình tự khởi đầu psaDb thuộc lá không có hộp TATA; Sự phiên mã đáp ứng với ánh sáng của psaDb phụ thuộc vào Inr, nhưng không phụ thuộc vào hộp TATA;
13	TATABO X2	112 (+)	TATAAAT	“hộp TATA”; hộp TATA được tìm thấy trong vùng ngược hướng 5' của gen legA đậu hà lan; sporamin A của khoai lang; hộp TATA được tìm thấy trong trình tự khởi đầu beta-phaseolin(Grace et al.); trình tự và sự giãn cách của yếu tố hộp TATA quan trọng cho sự khởi đầu chính xác.
14	CCA1ATL HCB1	119 (+)	AAMAAT CT	vị trí gắn kết CCA1; protein CCA1 (myb-yếu tố phiên mã liên quan đến) tương tác với hai đoạn lặp không hoàn hảo của AAMAATCT trong gen Lhcb1*3 của <i>Arabidopsis thaliana</i> Liên quan đến sự điều hòa bởi sắc tố thực vật.
15	CAATBO X1	121 (+)	CAAT	trình tự liên ứng trình tự khởi đầu CAAT” được tìm thấy trong gen legA của đậu hà lan; CAAT; legA; hạt; đậu hà lan (<i>Pisum</i>

				<i>sativum</i>) Shirsat A, Wilford N, Croy R, Boulter D Trình tự chịu trách nhiệm cho hoạt tính khởi đầu đặc hiệu mô của gen legumin đậu hà lan ở thuốc lá
16	SORLIP1 AT	138 (+)	GCCAC	Một trong “các trình tự biểu hiện quá mức trong trình tự khởi đầu được cảm ứng bởi ánh sáng (SORLIPs) trong <i>Arabidopsis</i>
17	DOFCOR EZM	152 (+)	AAAG	Vị trí lõi cần để gắn kết protein Dof ở ngô (Z.m.); protein Dof là protein gắn kết ADN, có thể chỉ với một ngón tay kẽm, và độc đáo với cây

Bảng 7 dưới đây thể hiện kết quả phân tích motif điều hòa cis (PLACE) của mảnh
khuyết p2Δ2.

Số Sr.	Tên yếu tố hoặc vị trí	Vị trí	Trình tự tín hiệu	Chức năng
1	RYREPEA TBNNAP A	8 (+)	CATGCA	“Đoạn lặp RY” được tìm thấy trong hộp RY/G (phức hợp chứa hai đoạn lặp RY và hộp G) của gen napA trong <i>Brassica napus</i> (B.n.); Được phát hiện trong khoảng -78 và -50; Cần để biểu hiện đặc hiệu hạt;
2	DOFCOR EZM	24(+), 29(+), 149(+), 384(+), 480(+), 514(+), 587(+), 592(+), 626(+), 675(+), 773 (+)	AAAG	Vị trí lõi cần để gắn kết protein Dof ở ngô/Bón cADN mã hóa các protein Dof, Dof1, Dof2, Dof3 và PBF, được phân lập từ ngô; PBF là protein Dof đặc hiệu nội nhũ liên kết với hộp prolamin
	POLLEN1 LELAT52	26(+), 478(+), 589(+)	AGAAA	Một trong hai yếu tố điều hòa phụ thuộc đồng thời chịu trách nhiệm hạt phấn hoạt hóa đặc hiệu của gen (L.e.) lat52 ở cà chua
4	MYBST1	32 (+)	GGATA	Motif lõi của vị trí gắn kết MybSt1 (thể tương đồng MYB khoai tây); dòng MybSt1 cDNA được phân lập bằng cách sử dụng miền A của khởi đầu CaMV 35S làm mẫu dò (Baranowskij et al. 1994)

5	GATABOX	33(+), 107(+), 279(+), 411(+), 552 (+) 560(+)	GATA	“Hộp GATA”; motif GATA trong trình tự khởi đầu CaMV 35S; Liên kết với ASF-2; Ba đoạn lặp hộp GATA được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của Cây thuốc lá cảnh (P.h.) protein liên kết diệp lục tố a/b, gen Cab22; Cần để biểu hiện ở mức cao, được điều hòa nhờ ánh sáng, và đặc hiệu mô; Được bảo toàn trong trình tự khởi đầu của tất cả gen Cab LHCII kiểu I;
6	GT1CONS ENUS	33(+), 279(+), 524(+), 560(+)	GRWAA W	vị trí gắn kết GT-1 liên ứng trong nhiều gen được điều hòa bởi ánh sáng, ví dụ, RBCS từ nhiều loài, PHYA từ yến mạch và lúa gạo, RCA và PETA rau bina, và CHS15 đậu; R=A/G; W=A/T; Để biên soạn, các yếu tố GT và nhân tố liên quan, xem Villain et al. (1996); GT-1 có thể làm ổn định phức hợp TFIIA-TBP-DNA (Hộp TATA); Cơ chế hoạt hóa của GT-1 có thể đạt được thông qua sự tương tác trực tiếp giữa TFIIA và GT-1; việc gắn kết yếu tố giống GT-1 với PR-1a Trình tự khởi đầu tác động đến mức độ sự biểu hiện gen cảm ứng bởi SA.
7	IBOXCORE	33(+), 107(+), 279(+), 560(+)	GATAA	“Hộp I”; “Hộp - I”; Ngược hướng trình tự bảo toàn của gen được điều hòa bởi ánh sáng của cả cây một lá mầm và cây hai lá mầm;
8	ASF1MOT IFCAMV	57(+)	TGACG	“vị trí gắn kết ASF-1” trong trình tự khởi đầu CaMV 35S; ASF-1 liên kết với hai Motif TGACG; (AS1); Được tìm thấy trong vị trí gắn kết HBP-1 của gen histon H3 lúa mì; Motif TGACG được tìm thấy trong nhiều trình tự khởi đầu và tham gia vào sự hoạt hóa dịch mã của nhiều gen bằng auxin và/hoặc axit salixylic
9	TGACGT VMAMY	57(+)	TGACGT	“motif TGACGT “ được tìm thấy trong trình tự khởi đầu alpha-Amylaza (Amy) <i>Vigna mungo</i> (V.m.); Được nằm giữa -128 và -123; Cần để biểu hiện mức cao alpha-Amylaza trong lá mầm của hạt đã nảy mầm;
10	WRKY71 OS	57(+), 318 (+)	TGAC	“Lõi của TGAC chứa hộp W” của, ví dụ, trình tự khởi đầu Amy32b ; Vị trí gắn kết của WRKY71 lúa gạo, chất ức chế phiên mã của con đường truyền tín hiệu

				giberelin; protein WRKY mùi tây liên kết đặc hiệu với TGAC chứa yếu tố hộp W trong nhóm 10 liên quan đến sự phát sinh bệnh (PR-10) genes (Eulgem et al., 1999)
11	ABRELAT ERD1	59(+)	ACGTG	Trình tự giống ABRE (từ -199 đến -195) cần để sự biểu hiện được cảm ứng bởi sự úa vàng của erd1 (đáp ứng sớm với sự mất nước) ở <i>Arabidopsis</i> ;
12	ACGTAT ERD1	59(+), 201(+), 449(+), 555(+)	ACGT	trình tự ACGT (từ -155 đến -152) cần cho sự để biểu hiện được cảm ứng bởi sự úa vàng của erd1 (đáp ứng sớm với sự mất nước) ở <i>Arabidopsis</i>
13	MYBCOR E	68(+)	CNGTTR	Vị trí gắn kết cho tất cả MYB động vật và ít nhất hai protein MYB thực vật là ATMYB1 và ATMYB2, đều được phân lập từ <i>Arabidopsis</i> ; ATMYB2 tham gia vào việc điều hòa gen đáp ứng với áp lực nước ở <i>Arabidopsis</i> ; protein MYB (MYB.Ph3) cây thuốc lá cảnh tham gia vào việc điều hòa quá trình sinh tổng hợp flavonoid (Solano et al.)
14	CACTFTP PCA1	80(+), 69(+), 307(+), 17(+), 699(+)	YACT	Mô-đun biểu hiện ở thịt lá 1/ được tìm thấy trong yếu tố điều hòa cis trong vùng xa của phosphoenolpyruvat carboxylaza (ppcA1) của cây hai lá mầm C4
15	HDZIP2A TATHB2	83(+)	TAATMA TTA	Vị trí gắn kết của gen hộp cân bằng <i>Arabidopsis</i> (A.T.) (ATHB-2) được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của nó; Được nằm giữa -72 và -80; Tương tự với trình tự liên kết HD-ZIP-2; ATHB-2 được điều hòa bằng tín hiệu ánh sáng mà có chức năng như yếu tố tự điều hòa nghịch của gen của nó; M=C/A;
16	POLASIG 3	84(+), 423(+), 649(+)	AATAAT	“Tín hiệu polyA thực vật”; Trình tự liên ứng cho cây.

17	RỄMOTIF TAPOX1	92(+), 206(+), 259(+), 269(+), 298(+), 333(+), 364(+), 412(+), 506(+)	ATATT	Motif được phát hiện cả trong trình tự khởi đầu của rolD; Elmayan T, Tepfer M Đánh giá ở thuốc lá về tính đặc hiệu cơ quan và độ bền của trình tự khởi đầu rolD, miền A của trình tự khởi đầu 35S và trình tự khởi đầu 35S ² Transgenic Res 4:388-396 (1995)
18	INRNTPS ADB	97(+), 723(+)	YTCANT YY	Yếu tố Inr (yếu tố khởi đầu)” được tìm thấy trong trình tự khởi đầu psaDb thuốc lá không chứa hộp TATA; sự phiên mã đáp ứng với ánh sáng của psaDb phụ thuộc vào Inr, không phụ thuộc vào hộp TATA.
19	CAATBO X1	99(+), 400(+), 499(+), 648(+), 742 (+)	CAAT	Các trình tự chịu trách nhiệm hoạt tính khởi đầu đặc hiệu mô của gen legumin đậu hà lan ở thuốc lá
20	POLASIG 1	117(+), 188(+), 264(+), 484 (+)	AATAAA	“Tín hiệu PolyA”; tín hiệu poly A được tìm thấy trong gen legA của đậu hà lan, alpha-amylaza lúa gạo; -10 đến -30 trong trường hợp gen của động vật. Các yếu tố ngược chiều gần đó (NUE) trong <i>Arabidopsis</i> (Loke et al. 2005)
21	EBOXBN NAPA	175(+), 499(+)	CANNTG	Hộp E của gen dự trữ protein napA của <i>Brassica napus</i>
22	MYCONS ENSUSAT	175(+), 499(+)	CANNTG	vị trí nhận diện MYC được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của gen đáp ứng sự mất nước-rd22 và nhiều gen khác ở <i>Arabidopsis</i> ; Vị trí gắn kết của trình tự nhận diện ATMYC2/ MYC trong trình tự khởi đầu CBF3; Vị trí gắn kết của ICE1 (tác nhân gây cảm ứng sự biểu hiện CBF 1) điều hòa sự phiên mã của gen CBF/DREB1 trong điều kiện lạnh ở <i>Arabidopsis</i> ; ICE1 (Chinnusamy et al., 2004) ;)
23	GTGANT G10	178(+), 545(+)	GTGA	“motif GTGA” được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của thuốc lá (N.t.) gen hạt phấn muộn g10 thể hiện sự thể tương đồng với pectat lyaza và là thể tương đồng

				giả định của gen cà chua lat56; được nằm giữa -96 và -93
24	ACGTAB OX	200 (+)	TACGTA	“Hộp A” theo danh pháp của yếu tố ACGT của Foster et al. (FASEB J 8:192-200 (1994)); một trong các yếu tố ACGT; Được tìm thấy trong gen ocs; vị trí gắn kết RITA-1 (Izawa et al. 1994); “motif G” bởi Toyofuku et al. (1998); motif G và motif TATCCAY (motif GATA là trình tự đối nghĩa của nó; chịu trách nhiệm ức chế đường (Toyofuku et al. 1998)
25	SEF4MOT IFGM7S	228 (+)		“vị trí gắn kết SEF4”; trình tự liên ứng đậu nành (G.m.) được tìm thấy trong vùng ngược hướng 5' (-199) của gen beta-conglyxinin (7S globulin) (Gmg17,1); “Liên kết với SEF4 (yếu tố phôi đậu nành 4)”; R=A/G; đậu nành; hạt; protein lưu giữ; 7S; globulin; beta-conglyxinin;
26	ARR1AT	233(+), 238(+), 433(+), 519(+), 567(+), 572(+), 602 (+)	NGATT	“yếu tố gắn kết ARR” được tìm thấy trong <i>Arabidopsis</i> ; ARR1 là chất điều hòa đáp ứng; N=G/A/C/T; AGATT được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của lúa gạo gen haemoglobin-2 (NSHB) không cộng sinh (Ross et al., 2004)
27	TATABO X5	242(+), 428(+)	TTATTT	“Hộp TATA”; Hộp TATA được tìm thấy trong vùng ngược hướng 5' của gen glutamin synthetaza đậu Hà Lan (<i>Pisum sativum</i>); yếu tố TATA chức năng bằng phân tích in vivo
28	TATABO XOSPAL	243(+), 270(+)	TATTTAA	Vị trí gắn kết cho OsTBP2, được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của gen pal lúa gạo mã hóa phenylalanin amoniacyl-lyase; OsTFIIB kích thích hoạt tính liên kết và uốn cong ADN của OsTBP2 và sự phiên mã qua trung gian OsTBP2 được tăng cường hiệp đồng từ trình tự khởi đầu pal
29	S1FBOXS ORPS1L21	252(+)	ATGGTA	“Hộp S1F” được bảo toàn trong cả các gen RPS1 và RPL21 rau bina (<i>S.o.</i>) mã hóa protein ribosom lập thể S1 và L21, tương ứng; Yếu tố âm; Có thể đóng vai trò trong việc điều hòa giảm hoạt tính trình tự khởi đầu RPS1 và RPL21 (Lagrange et al., 1993);

30	TATABO X3	260(+), 299(+), 334(+), 365(+)	TATTAAT	“Hộp TATA”; Hộp TATA được tìm thấy trong vùng ngược hướng 5’ của gen sporamin A khoai lang
31	PRECONS CRHSP70 A	2779+), 663(+)	SCGAYN RNNNNN NNNNNN NNNNHD	Trình tự liên ứng của PRE (yếu tố đáp ứng lập thể) trong trình tự khởi đầu của HSP70A trong <i>Chlamydomonas</i> ; Tham gia vào sự cảm ứng gen HSP70A bởi cả MgProto và ánh sáng.
32	NTBBF1A RROLB	308(+)	ACTTTA	Vị trí gắn kết NtBBF1 (protein Dof từ thuốc lá) trong gen rolB <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (A.r.); Được tìm thấy trong miền điều hòa B (-341 to -306); Cần cho sự biểu hiện đặc hiệu mô và cảm ứng auxin; rolB; Dof; auxin; miền B; rễ; chồi; mô phân sinh; mạch;
33	WBOXAT NPR1	317(+)	TTGAC	“Hộp W” được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của gen NPR1 <i>Arabidopsis thaliana</i> (A.t.) ; Được nằm giữa +70 và +79 liên tiếp; Chúng được nhận diện đặc hiệu bởi Protein gắn kết AND WRKY được cảm ứng bởi axit salicylic (SA);
34	CURECO RECR	341(+)	GTAC	GTAC là lõi của CuRE (yếu tố đáp ứng đồng) được tìm thấy trong các gen Cyc6 và Cpx1 trong <i>Chlamydomonas</i> ; cũng tham gia vào đáp ứng oxy của các gen này;
35	CARGNC AT	344(+)	CCWWW WWWW WGG	Motif CArG không tiêu chuẩn (CC-Wx8-GG) được tìm thấy trong vùng trình tự khởi đầu của DTA1 (AtGA2ox6); Yếu tố cis thích hợp để đáp ứng với AGL15 (giống AGAMOUS 15) in vivo / protein miền MADS phôi giống AGAMOUS 15 trực tiếp điều hòa sự biểu hiện của gen mã hóa enzym tham gia vào sự chuyển hóa gibberelin. Plant Cell 16:1206-1219 (2004)
36	CARGCW 8GAT	345(+)	CWWWW WWWWG	Biến thể của motif CArG với lõi giàu A/T dài hơn; Vị trí gắn kết cho AGL15 (giống AGAMOUS 15); W=A/T; CArG; AGL15; AGAMOUS; MADS; <i>Arabidopsis thaliana</i> Tang W, Perry SE. Binding site selection for plant MADS domain protein AGL15: an in vitro and in

				vivo. J Biol Chem.278:28154-28159 (2003)
37	LECPLEA CS2	360(+)	TAAAAT AT	Yếu tố lõi trong yếu tố cis liên kết LeCp (Cys proteaza cà chua) (từ -715 to -675) trong gen LeAcs2; xystein proteaza; etylen; xylanaza; ACS; <i>Lycopersicon esculentum</i> (cà chua) Matarasso N, Schuster S, Avni A. Xystein proteaza của cây có chức năng kép làm yếu tố điều hòa của sự biểu hiện gen axit 1-aminocyclopropan-1-carboxylic synthaza. Plant Cell. 17: 1205-1216. (2005)
38	TATABO X2	374(+), 733(+)	TATAAA T	“Hộp TATA”; Hộp TATA được tìm thấy trong vùng ngược hướng 5’ của legA đậu hà lan; sporamin A của khoai lang; Hộp TATA được tìm thấy trong trình tự khởi đầu beta-phaseolin (Grace et al.); trình tự và khoảng cách của yếu tố hộp TATA quan trọng cho khởi đầu chính xác.
39	TAAAGS TKST1	383(+)	TAAAG	motif TAAAG được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của gen KST1 Solanum tuberosum (S.t.); Vị trí đích cho biểu hiện gen đặc hiệu tế bào bảo vệ kiểm soát protein StDof1 tác động trans; gen KST1 mã hóa kênh dòng vào K ⁺ của tế bào bảo vệ.
40	AMYBOX 2	452(+)	TATCCAT	“hộp amylaza”; “yếu tố amylaza”; Trình tự bảo toàn được tìm thấy trong vùng ngược hướng 5’ của gen alpha-amylaza của lúa gạo, lúa mì, lúa mạch; “hộp amylaza” (Huang et al. 1990); “yếu tố amylaza” (Hwang et al., 1998); ba yếu tố cis cần để biểu hiện alpha-amylaza Amy3D lúa gạo khi thiếu đường Plant Mol Biol 36:331-341 (1998)
41	TATCCA YMOTIFO SRAMY3 D	452(+)	TATCCA Y	“motif TATCCAY” được tìm thấy trong lúa gạo (O.s.) RAmy3D alpha-amylaza trình tự khởi đầu; Y=T/C; motif GATA là trình tự đối nghĩa của nó; motif TATCCAY và motif G chịu trách nhiệm ức chế đường (Toyofuku et al. 1998);
42	TATCCA OSAMY	452(+)	TATCCA	Yếu tố “TATCCA” được tìm thấy trong trình tự khởi đầu alpha-amylaza của lúa gạo (O.s.) ở vị trí ca.90 đến 50bp ngược

				hướng của vị trí khởi đầu phiên mã; Vị trí gắn kết của OsMYBS1, OsMYBS2 và OsMYBS3 điều tiết sự điều hòa đường và hormon của sự biểu hiện gen alpha-amylaza;
43	MYB1AT	490(+)	WAACCA	vị trí nhận diện MYB được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của gen đáp ứng sự mất nước rd22 và nhiều gen khác ở <i>Arabidopsis</i> ; W=A/T;
44	- 300ELEMENT	510(+)	TGHAAARK	Ngược hướng của trình tự khởi đầu từ gen B-hordein của lúa mạch và gen alpha-gliadin, gamma-gliadin, và glutenin trọng lượng phân tử thấp của lúa mì
45	NODCON1GM	514(+)	AAAGAT	Một trong hai trình tự liên ứng nodulin giả định (NODCON2GM); nodulin <i>Glycine max</i> (đậu nành) Sandal NN, Bojsen K, Marcker KA. A họ nhỏ của gen đặc hiệu nốt sần từ đậu nành. Nucleic Acids Res. 15:1507-1519 (1987).
46	OSE1ROO TNODULE	514(+)	AAAGAT	Một trong các motif trình tự liên ứng của yếu tố đặc hiệu cơ quan (OSE) đặc trưng của trình tự khởi đầu được hoạt hóa trong tế bào bị nhiễm của nốt rễ
47	BIHD1OS	538(+)	TGTCA	Vị trí gắn kết của OsBIHD1, yếu tố phiên mã homeodomain của lúa gạo BELL; HD; homeodomain; <i>Oryza sativa</i> (lúa gạo) Luo H, Song F, Goodman RM, Zheng Z. Điều hòa tăng OsBIHD1, gen mã hóa yếu tố phiên mã BELL homeodomain của lúa gạo, trong đáp ứng kháng bệnh. Plant Biol (Stuttg). 7: 459-468 (2005).
48	EECCRCA H1	603 (+)	GANTTNC	“EEC”; motif liên ứng của hai yếu tố trình tự tăng cường, EE-1 và EE-2, đều được tìm thấy trong vùng trình tự khởi đầu của <i>Chlamydomonas</i> Cah1 (mã hóa carbonic anhydrase quanh tế bào chất); Vị trí gắn kết của yếu tố phiên mã Myb LCR1 (xem Yoshioka et al, 2004); N=A/G/C/T;
49	SORLIP1 AT	608(+) 759(+)	GCCAC	Một trong “các trình tự biểu hiện quá mức trong trình tự khởi đầu được cảm ứng bởi ánh sáng (SORLIPs) ở <i>Arabidopsis</i>

50	SURECOR EATSULT R11	628(+)	GAGAC	Lỗi của yếu tố đáp ứng lưu huỳnh (SURE) được tìm thấy trong trình tự khởi đầu của SULTR1;1 gen vận chuyển sulfat ái lực cao ở <i>Arabidopsis</i>
51	RAV1AA T	657(+)	CAACA	Trình tự liên ứng gắn kết của yếu tố phiên mã <i>Arabidopsis</i> , RAV1/Mức biểu hiện của RAV1 khá cao trong lá và thân thể hoa thị.
52	DPBFCOR EDCDC3	659(+)	ACACNN G	Nhóm yếu tố phiên mã bZIP mới, trình tự lõi gắn kết DPBF-1 và 2 (yếu tố gắn kết trình tự khởi đầu Dc3 1 và 2); Được tìm thấy trong cà rốt (D.c.) trình tự khởi đầu Dc3; sự biểu hiện Dc3 thường đặc hiệu phôi, và cũng có thể được cảm ứng bởi ABA.
53	LTRECOR EATCOR1 5	663(+)	CCGAC	Lỗi của độ yếu tố đáp ứng nhiệt thấp (LTRE) của gen cor15a ở <i>Arabidopsis</i> /một phần của đoạn lặp C (đoạn lặp C), TGGCCGAC, lặp lại hai lần trong trình tự khởi đầu cor15a.
54	MYBPLA NT	706 (+)	MACCWA MC	vị trí gắn kết MYB của cây
55	CCA1ATL HCB1	740(+)	AAMAAT CT	vị trí gắn kết CCA1; protein CCA1 (yếu tố phiên mã liên quan đến myb. tương tác với hai đoạn lặp không hoàn hảo của AAMAATCT trong gen Lhcb1*3 của <i>Arabidopsis thaliana</i> được liên quan đến sự điều hòa bởi sắc tố thực vật.

Ví dụ 8: Biến nạp cấu trúc khuyết trong cây trồng mô hình

Để xác định hoạt tính của hai cấu trúc khuyết, pMDCA1, và pMDCA2, như được mô tả chi tiết ở phần khác trong bản mô tả này, thể biến nạp pMDC p2Δ1-1, pMDC p2Δ2- 1 dương tính thu được và được khẳng định bằng PCR cũng như thử nghiệm hóa mô GUS trong cả *Arabidopsis* (Fig. 6A, B), và lúa gạo (Fig. 16).

Sự định lượng hoạt tính GUS trong mẫu lá lúa biến nạp (Fig. 16) cho thấy rằng hoạt tính trình tự khởi đầu của p2Δ1 hoặc p2Δ2 thấp hơn khoảng 2-3 lần hoạt tính của trình tự khởi đầu p2 hoàn chỉnh (Fig. 14, và Fig. 15). Bảng 8 và bảng 9 dưới đây thể hiện kết quả dưới dạng đồ thị Fig. 14, và Fig. 15 tương ứng.

Bảng 8

Mã cây	Kết quả thử nghiệm MUG			
	pMOI MU / μ g protein/phút	pMOI MU / μ g protein/phút	Trung bình	Sai số chuẩn
Đối chứng EP	1,69	3,9	2,795	1,105
CaMV35S	25153,37	30980,18	28066,775	2913,405
p2 Δ 1-Exp.2-8B	987,76	1310,55	1149,155	161,395
p2 Δ 1-Exp.1-7B	694,69	948,23	821,46	126,77
p2 Δ 2-Exp.1-5A	581,49	790,14	685,815	104,325
p2 Δ 2-Exp.1-6B	3159,02	4307,244783	3733,132392	574,1123915
p2-8B-7-4	1607,4	2147,694913	1877,547456	270,1474565
p2-8A-15-9	3279,52	4287,926852	3783,723426	504,203426

Bảng 9

Mã cây	Kết quả thử nghiệm MUG			
	pMOI MU / μ g protein/phút	pMOI MU / μ g protein/phút	Trung bình	SE
Đối chứng EP	1324,06	2251,2	1787,63	463,57
Cây CaMV35S-T1	63433,07	82376,78	72904,925	9471,855
p2 Δ 1-Exp.2-8B	5772,9	8100,87	6936,885	1163,985
p2 Δ 1-Exp.1-7B	21325,24	29711,92	25518,58	4193,34
p2 Δ 2-Exp.1-5A	8335	10869,04	9602,02	1267,02
p2 Δ 2-Exp.1-6B	5848,89	7890,37	6869,63	1020,74
p2-8B-7-4	3577,43	4915,02	4246,225	668,795
p2-8A-15-9	59131,81	81472,72	70302,265	11170,455

Các số liệu này như đã được thảo luận ở trên đề xuất rằng trình tự khởi đầu p2 đầy đủ có thể bao gồm trình tự nằm ngược chiều về phía các cấu trúc khuyết, hỗ trợ sự biểu hiện của gen quan tâm được liên kết có điều khiển với trình tự khởi đầu này.

Ví dụ 9: Hoạt tính trình tự khởi đầu p2 trong điều kiện áp lực

Khi đã xác định được rằng trình tự khởi đầu p2, và các cấu trúc khuyết có thể điều khiển biểu hiện của gen quan tâm, GUS trong trường hợp này, được kiểm tra về trình tự khởi đầu có biểu hiện hoạt tính khác nhau bất kỳ khi có mặt tác nhân gây áp lực như muối, nước, hoặc nhiệt độ (nóng/lạnh) hay không.

Trong hai cây Arabidopsis chuyển gen khác nhau mang trình tự khởi đầu p2 được

liên kết có điều khiển với GUS, cây giai đoạn ra hoa (48 ngày tuổi), hoặc chuyển gen lúa gạo được gây áp lực muối (NaCl) nồng độ 150mM trong 2 giờ và 5 giờ tương ứng. Như được thể hiện trong Fig. 9, trong *Arabidopsis* chuyển gen, sự biểu hiện GUS tăng 1-2 lần khi tiếp xúc với áp lực muối. Fig. 10 thể hiện nhuộm GUS hóa mô định tính ở cây *Arabidopsis* dưới áp lực muối. Ở cây lúa gạo chuyển gen, từ Fig. 11 và Fig. 12 có thể thấy được rằng là khoảng sự biểu hiện GUS tăng 1,3 lần theo thời gian.

Arabidopsis chuyển gen mang trình tự khởi đầu p2 cũng được cho tiếp xúc với áp lực nước bằng cách không tưới nước cho cây 45 ngày tuổi. Trái ngược với kết quả thu được trong thử nghiệm áp lực muối, quan sát thấy rằng áp lực nước dẫn đến việc giảm mức GUS trong lá được lấy mẫu sau 3, và 11 ngày (Fig. 13), nhờ đó sự biểu hiện chỉ bị hạn chế ở rễ.

Cây lúa gạo chuyển gen mang trình tự khởi đầu p2 được tiếp xúc với áp lực nhiệt độ lạnh (4°C trong 2 giờ). Sự biểu hiện GUS không thay đổi. Cây cũng được tiếp xúc riêng rẽ với áp lực nhiệt (42°C trong 4 giờ). Tương tự như áp lực lạnh, thậm chí cả áp lực nhiệt, mức độ biểu hiện GUS không thay đổi.

Tóm lại là các số liệu này cho thấy rằng trình tự khởi đầu từ bông, thể hiện hoạt tính cơ định ở các loại mô khác nhau. Hơn nữa, trình tự khởi đầu này cũng có vai trò ở các cây khác, như lúa gạo, và *Arabidopsis*. Hơn nữa, trình tự khởi đầu cũng thể hiện đáp ứng khác nhau với áp lực muối, và áp lực nước, nhưng không bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ. Phân tích khuyết trong cấu trúc có thấy rằng trong trình tự khởi đầu có các yếu tố tham gia vào việc tăng cường hoạt tính trình tự khởi đầu. Việc đặc trưng hóa trình tự khởi đầu này cho phép sử dụng trình tự khởi đầu để tạo ra cây chuyển gen với sự biểu hiện khác loại của gen quan tâm được liên kết có điều khiển, mà sự biểu hiện của nó có thể trong mô cây, hoặc cụ thể là rễ để đáp ứng với áp lực nước.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cấu trúc ADN chứa trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển sự biểu hiện của gen khác loại cần quan tâm được liên kết điều khiển được, trình tự khởi đầu này được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1; và

(b) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO:10,

trong đó trình tự khởi đầu này được liên kết điều khiển được với đoạn gen khác loại.

2. Vector ADN chứa cấu trúc ADN theo điểm 1.

3. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa cấu trúc ADN theo điểm 1, trong đó tế bào chủ này có nguồn gốc vi khuẩn, nấm hoặc thực vật.

4. Tế bào chủ tái tổ hợp chứa vector ADN theo điểm 2, trong đó tế bào chủ này có nguồn gốc vi khuẩn hoặc nấm.

5. Thực vật chuyển gen hoặc một bộ phận của nó, bao gồm hạt, mà trong bộ gen của nó chứa, cấu trúc ADN chứa trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển sự biểu hiện của gen khác loại cần quan tâm được liên kết điều khiển, trình tự khởi đầu này được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1; và

(b) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO:10,

trong đó trình tự khởi đầu này được liên kết điều khiển được với đoạn gen khác loại.

6. Thực vật chuyển gen theo điểm 5, trong đó thực vật này là cây một lá mầm hoặc hai lá mầm.

7. Phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) thu tế bào thực vật;

b) thu cấu trúc ADN chứa trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển sự biểu hiện của gen khác loại cần quan tâm được liên kết điều khiển được, trong đó trình tự khởi đầu này

được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1; và
 - (ii) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO:10, trong đó trình tự khởi đầu này liên kết điều khiển được với đoạn gen khác loại;
- c) biến nạp tế bào thực vật này với cấu trúc ADN của bước (b) để thu được tế bào thực vật đã biến nạp; và
- d) chọn tế bào thực vật đã biến nạp biểu hiện gen cần quan tâm.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó sự biểu hiện của gen cần quan tâm là cơ định.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó sự biểu hiện của gen cần quan tâm được điều hòa tương ứng với áp lực muối hoặc nước.

10. Phương pháp theo điểm 7, trong đó sự biểu hiện của gen cần quan tâm là đặc hiệu rễ trong các điều kiện áp lực nước.

11. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước biến nạp này được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp bắn gen, phương pháp vi tiêm và phương pháp vĩ tiêm.

12. Phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu được tế bào thực vật;
- b) thu được cấu trúc ADN chứa trình tự khởi đầu có khả năng điều khiển sự biểu hiện của gen khác loại cần quan tâm được liên kết điều khiển được, trình tự khởi đầu này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (i) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1; và
 - (ii) ADN có trình tự ADN như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO:10, trong đó trình tự khởi đầu này được liên kết điều khiển được với đoạn gen khác loại;
- c) biến nạp tế bào chủ với cấu trúc ADN của bước (b) để thu được tế bào chủ tái tổ hợp;
- d) biến nạp tế bào thực vật này với tế bào chủ tái tổ hợp của bước (c) để thu được tế bào

thực vật biến nạp; và

e) chọn tế bào thực vật đã biến nạp biểu hiện gen cần quan tâm.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó sự biểu hiện của gen cần quan tâm là cơ định.

14. Phương pháp theo điểm 12, trong đó sự biểu hiện của gen cần quan tâm được điều hòa tương ứng với áp lực muối hoặc nước.

16. Phương pháp theo điểm 12, trong đó sự biểu hiện của gen cần quan tâm là đặc hiệu rễ trong các điều kiện áp lực nước.

16. Phương pháp theo điểm 12, trong đó bước biến nạp này được thực hiện bằng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm phương pháp biến nạp thông qua *Agrobacterium* và phương pháp biến nạp *in-planta*.

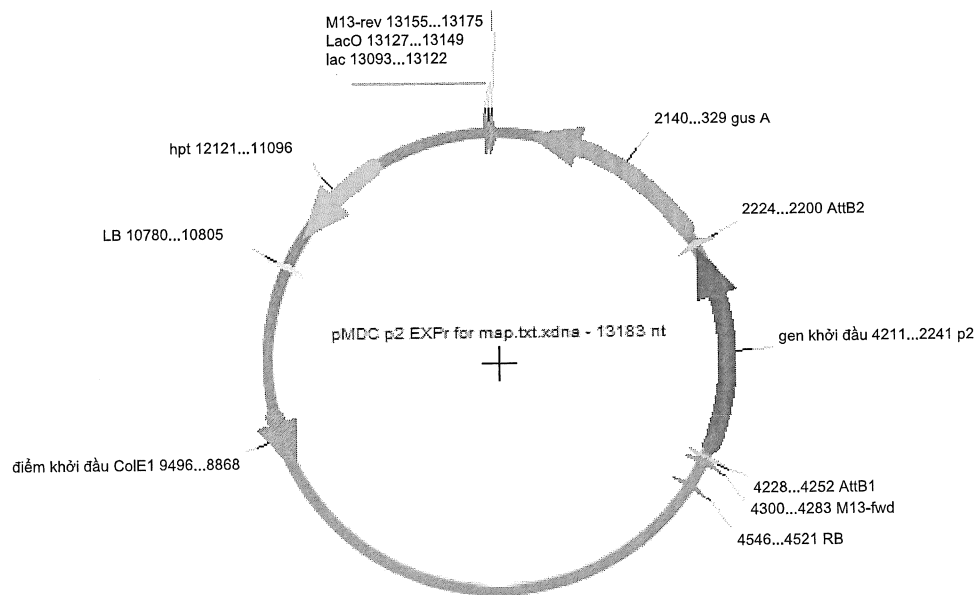


FIG. 1

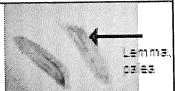
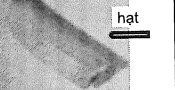
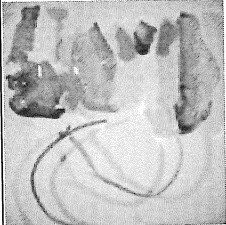
Cây trồng		Biểu hiện ổn định	
Lúa	Lá		
	Rễ		
		P2-8	P2-4
		EP	
		 	
Bông		Lá	Rễ
			

FIG. 2

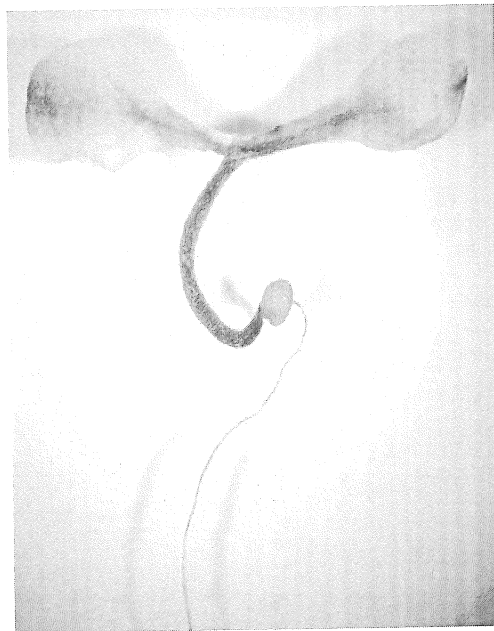


FIG. 3

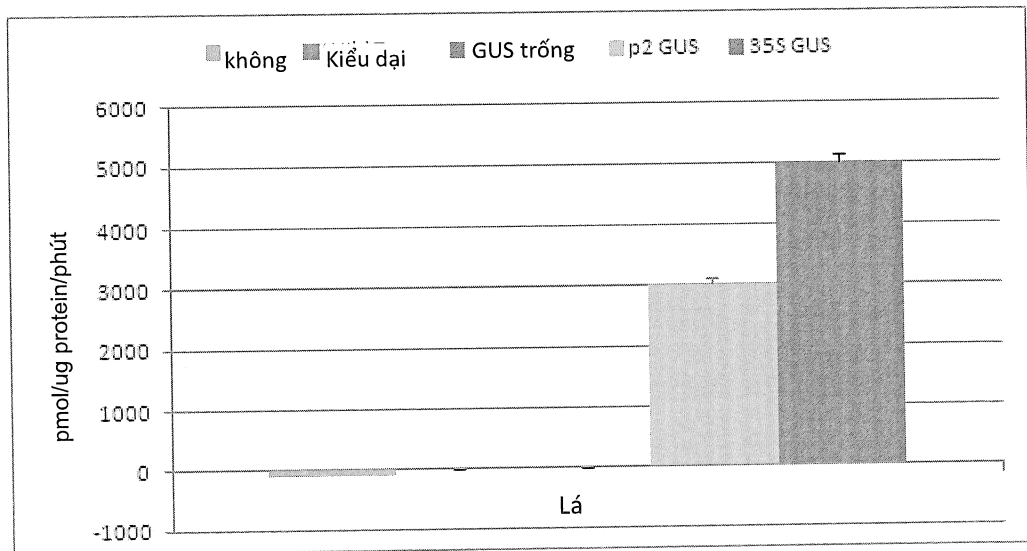


FIG. 4

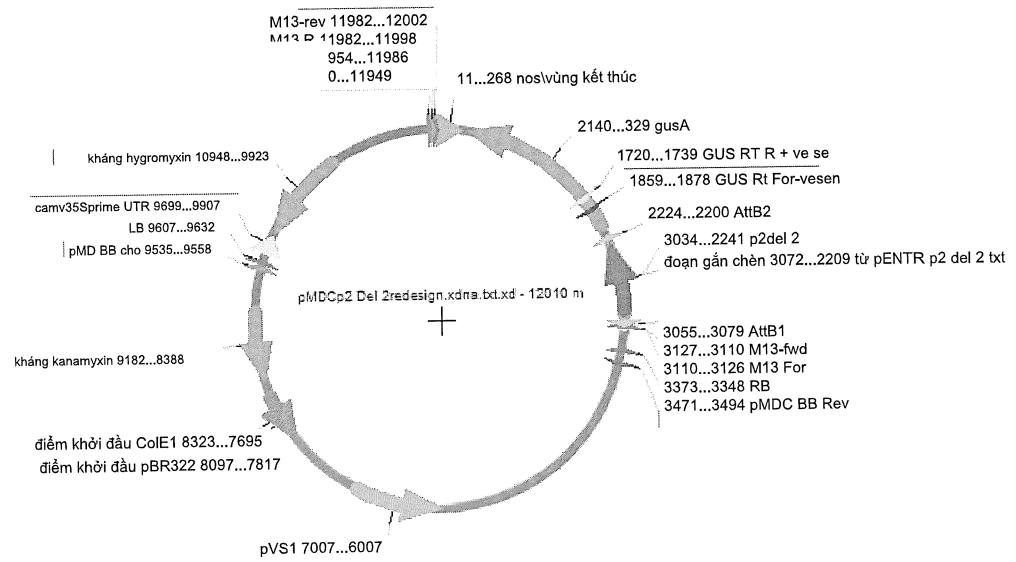


FIG. 5A

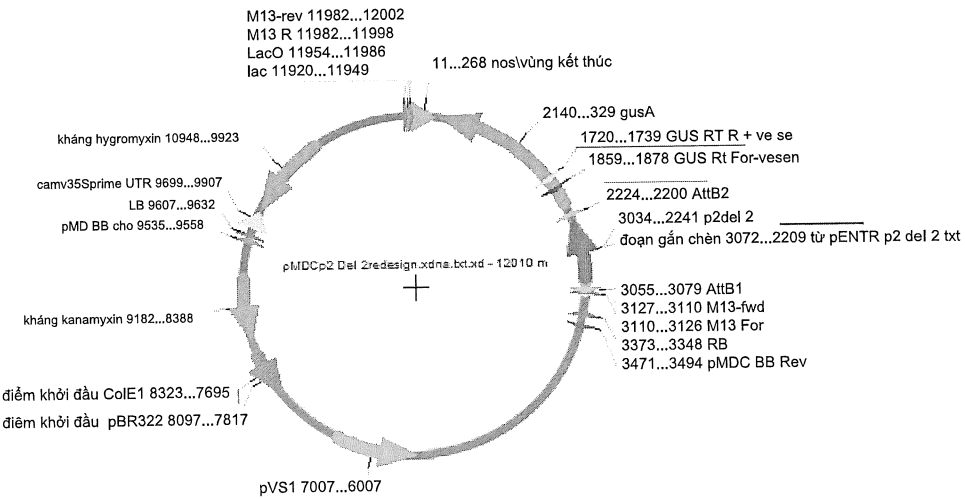


FIG. 5B

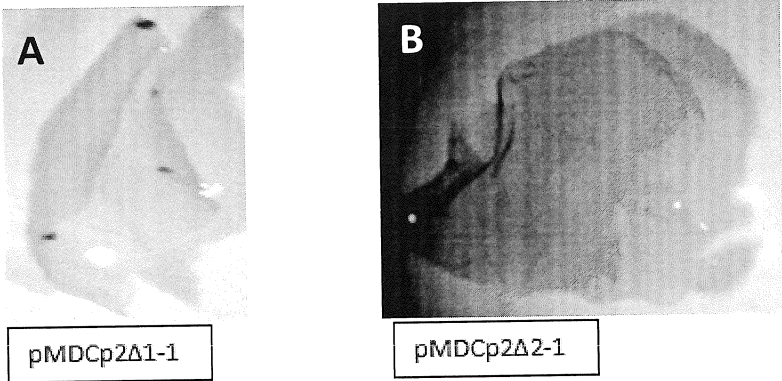
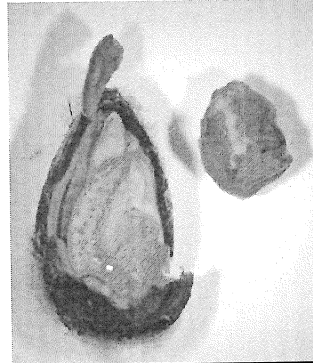


FIG. 6A-B



CT/pMDCp2-Exp2-1B-1

FIG. 7



FIG. 8

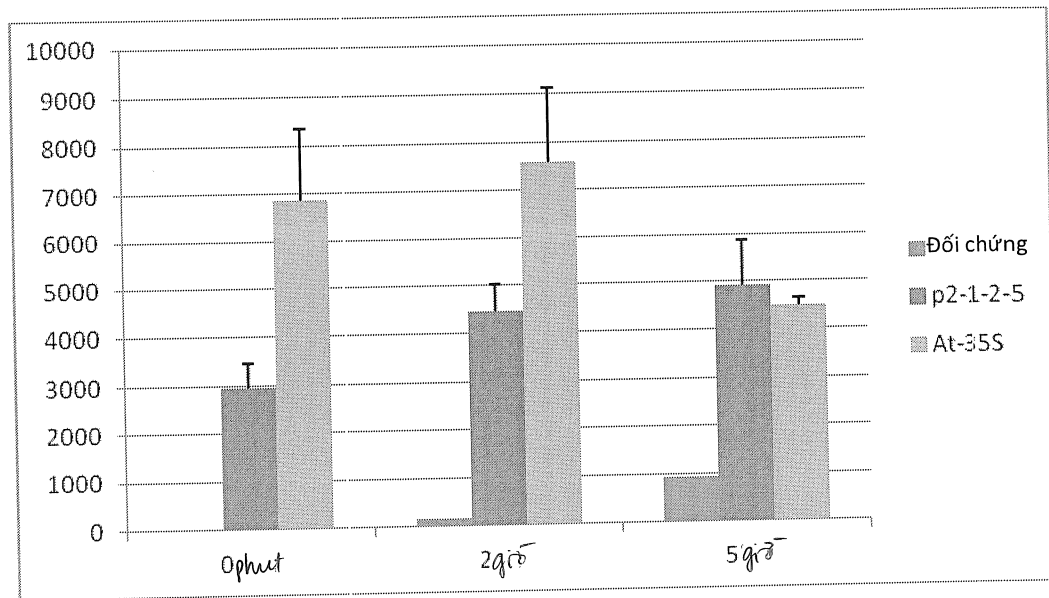


FIG. 9

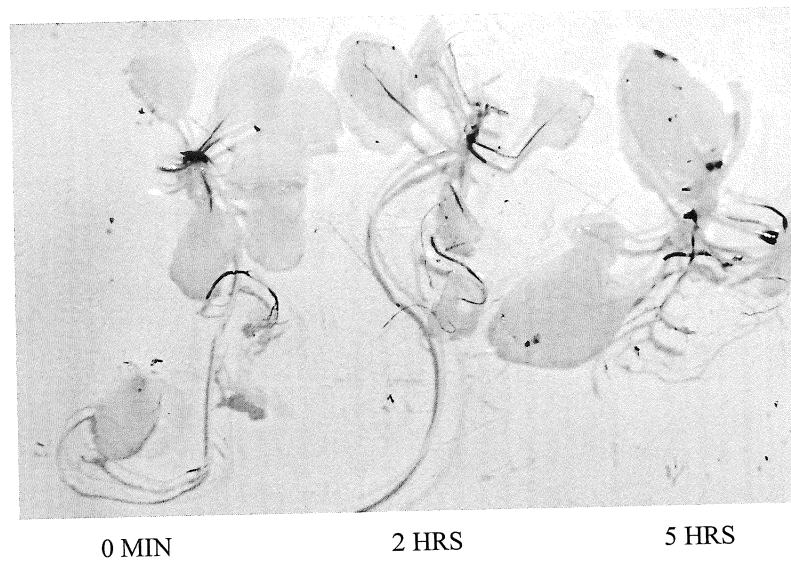


FIG. 10

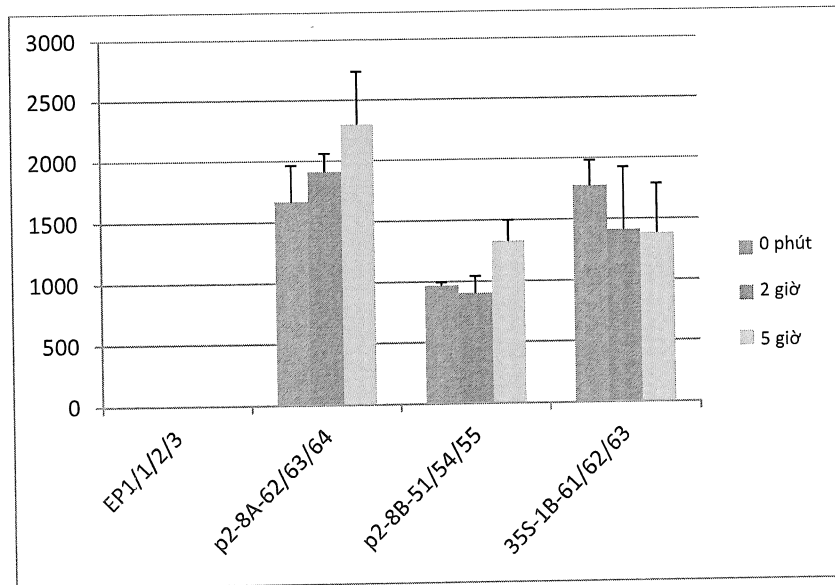


FIG. 11



FIG. 12

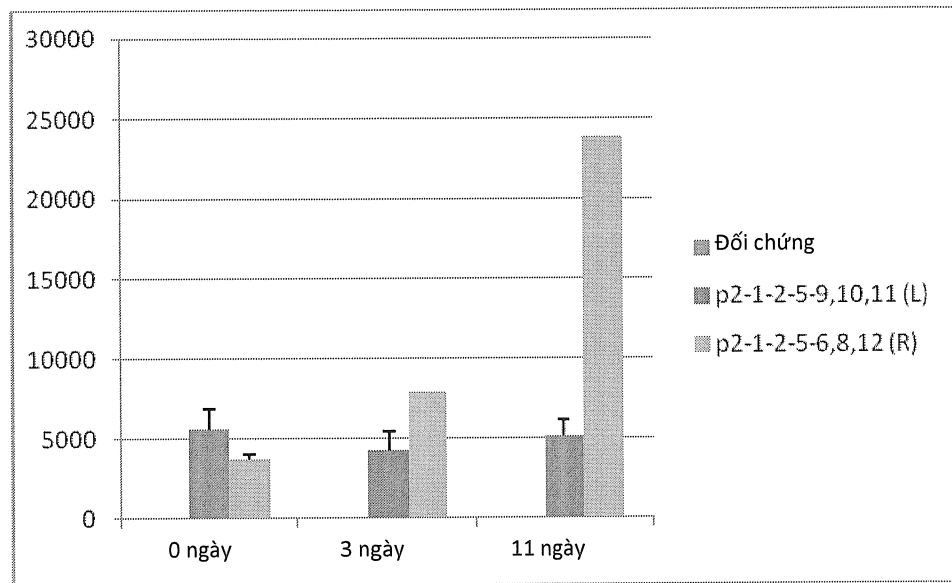


FIG. 13

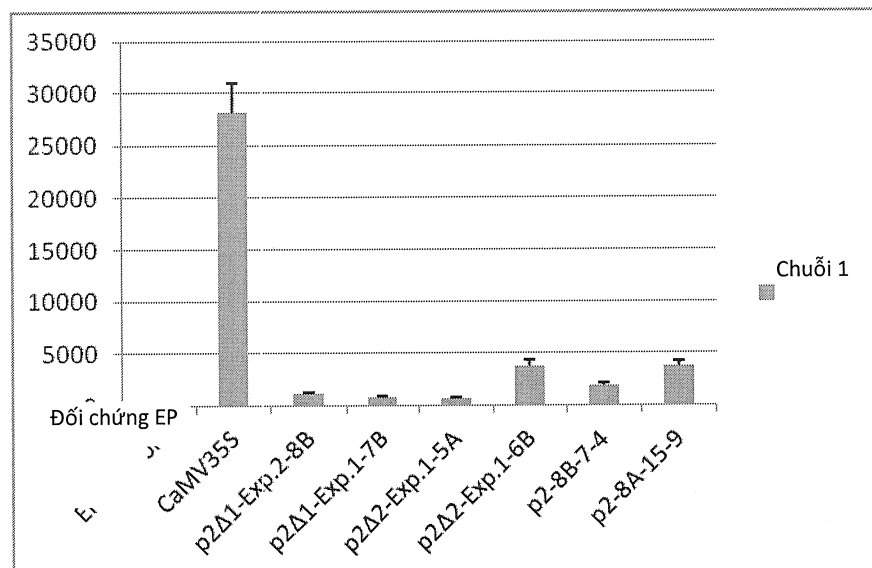


FIG. 14

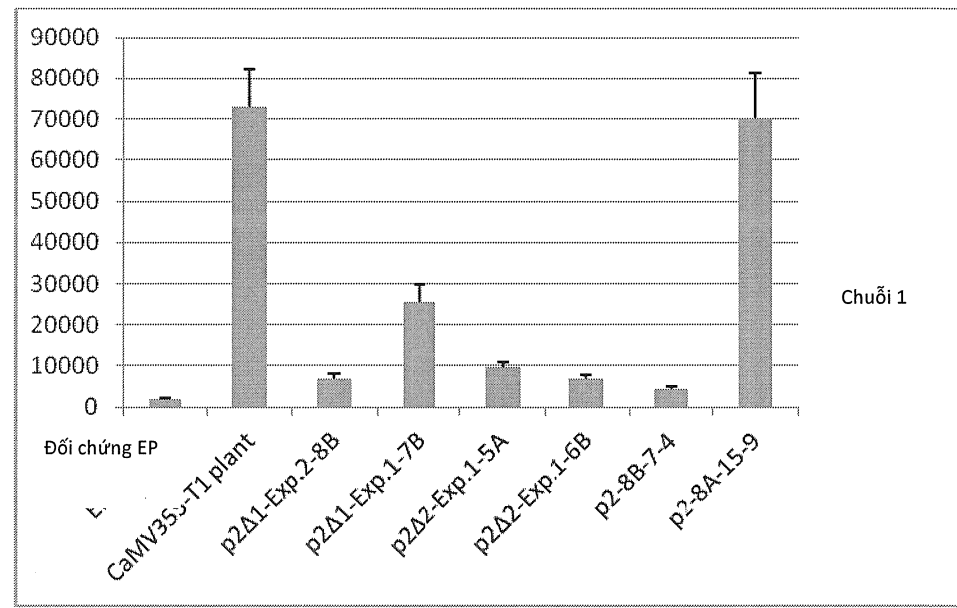
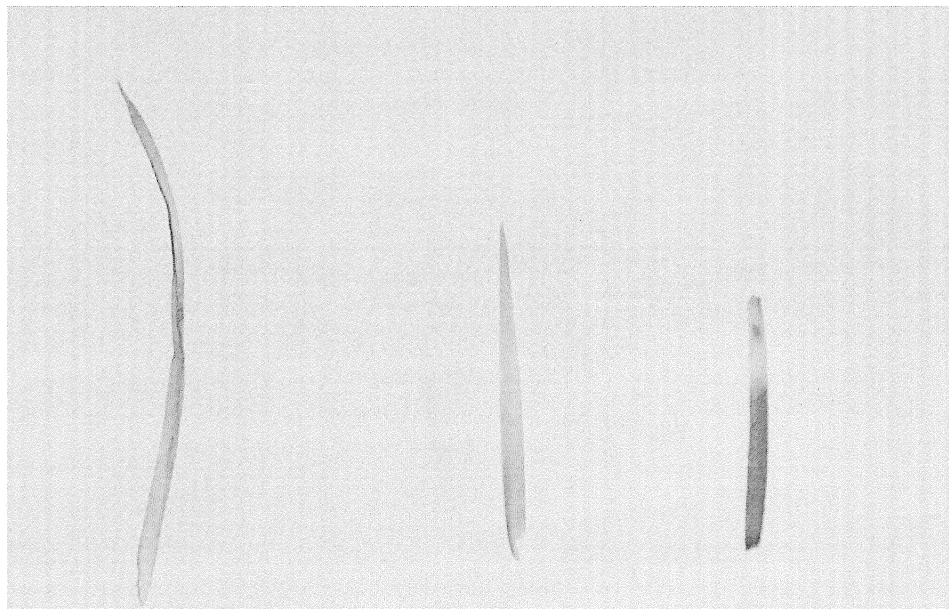


FIG. 15



p2Δ1-Exp.2-8B

p2Δ2-Exp.1-5A

p2-8A-15-9

FIG. 16

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> MAHARASHTRA HYBRID SEEDS COMPANY LIMITED (MAHYCO)
- <120> CẤU TRÚC ADN CHỨA TRÌNH TỰ KHỞI ĐẦU CỦA CÂY BÔNG, THỰC VẬT CHUYÊN GEN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC VẬT CHUYÊN GEN CHỨA CẤU TRÚC NÀY
- <130> PD014368IN-SC
- <160> 11
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 1956
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> trình tự nucleotit chiều dài 1956bp của trình tự khởi đầu cơ định thực vật ("p2") từ cây bông
- <400> 1
- | | |
|--|------|
| tgaccaactt tcccctaagg tacgagactt tctaaagtct ctcattttcca gaccctctaa | 60 |
| agccaatttt gacctattgc ttgactcctt ctttttctt gaaataactaa tgtctgatac | 120 |
| actcatgtct aatataggta tagggatata accttcccag aatcctccaa atatatagga | 180 |
| aaatatagaa aaaaatttga acatcccctt gtcagatact atgctccttg gacctgggtg | 240 |
| tagtgtagtg taaggatatg gtatagttag atatttcttt taagtttttt catgtatttg | 300 |
| gagaatcttt tgatgtcaga tatccatatt catgtctcag acacaagtgg tgaacatggt | 360 |
| atttcaacaa aatatgaagtg tcgcaacaac attggtcgga tatatatagg tatctgacac | 420 |
| tcatggatga gtttagagttg acatgtttta aagattatgg gtttcacatt acagacggag | 480 |
| ctttgctctc ttttcttggt tgatgctaaa ttggtattgt ggttattgctg ctaaagttaa | 540 |
| gatggctcgt ttgaatgatg tacaggcatg tgatattaaa gacccaaagc aaaacataga | 600 |
| gtggacagtg ccagaaggag gaggtggccc aggctattca gtcatgtaga atatatagc | 660 |
| taatcccctt tcttatcatt gctcgttgca aatatagttc tacttttgta ctttacaaca | 720 |
| aatacattat ctttgaaata attggtaagt cccatcttaa ttgctacaaa aatttaactt | 780 |
| tttactatac caaatgaaaa gaaagcttta aggagttcat gaaagttcat aatcttgagt | 840 |
| cttacccttg gatttgctt caatctcaag taatcaagggt ttccattta aataactgat | 900 |
| tggttaacgag tcaatatgac atagaagtct agctagtttc tcaaggcaat ccagaatggt | 960 |
| aagcagctgt tagaaatggt tcgaatcaag cgggtggctc caacaggact aaggttaaag | 1020 |
| gtttatacca gaaaacctca aaatccaaca tctcctctt tatctgcgga ttgtggataa | 1080 |
| agatgggtca cctgctctac gctattttat tgatgaatat actttgtttt cttctgcttt | 1140 |
| tatgttaatc atagttgttt actttgttag tgaataaaact gggtatcatg cagaggaaca | 1200 |

```

aaaaagaaaa ggataattat atagctgaaa cctaattgacg tgtagtctgt taatagacca 1260
ctaataatta atattttcaa tctttgataa catcaaataa aaataccatt tattccttat 1320
ctataaaaaa ggacacatta tcattatcac ttacatgtga aattataata aactttttta 1380
cgtaatatatt tagcaaactt tacagcattt ttgattggat ttatttaagt atggatatata 1440
ttaataaata ttttaaccgat aattataaaa ttttaaatat taatttactt taaatttgac 1500
atgtattatc tatattaatg taccataaaa taggatgcta aaatattaat agtataaatt 1560
ataaagcgta ttttacctca atataactag atatttactt aaataattat ttgattaaaa 1620
tttaacaacg tatccattat atatgggtcat aattgtagaa agaataaata accattgcaa 1680
ttgaatattg caaaagatga ttgaaaatgt atgtgggtgc atagtgatga gatacggtga 1740
taatgggatt ggattaggac atccaaaaga aaagcttctt tgatttgcca caagttcaca 1800
tcccgtgaga ctacagtttg gttgaacaat aatctcaaca cccgacagga cccaaagcaa 1860
attcagggtt cacggactac tctccaccaa acttttctcc attcattcct ctataaataa 1920
caatctctgg gtagcttgcc acatcataaa aaaagt 1956

```

<210> 2

<211> 39

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi xuôi với vị trí PstI và vị trí CACC để tạo ra SEQ ID

NO: 1

<400> 2

cacctgcagt gaccaacttt cccctaaggt acgagactt 39

<210> 3

<211> 36

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> mỗi ngược với vị trí SacI để tạo ra SEQ ID NO: 1

<400> 3

gagctcactt tttttatgat gtggcaagct acccag 36

<210> 5

<211> 12

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit của motif nhận biết CARGNCAT trong trình tự khởi đầu p2

<400> 5

ccataaaaata gg

12

<210> 7
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của motif nhân biết CIACADIANLELHC trong trình tự khởi đầu p2

<400> 7
 caaggcaatc 10

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit của motif nhân biết PRECONSCRHSP70A trong trình tự khởi đầu p2

<400> 8
 ccgataatta taaaatttta aata 24

<210> 9
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mảnh loại bỏ p2?1 của trình tự khởi đầu p2

<400> 9
 tcccggtgaga ctacagtttg gttgaacaat aatctcaaca cccgacagga cccaaagcaa 60
 attcagggtt cacggactac tctccaccaa actttttctcc attcattcct ctataaataa 120
 caatctctgg gtagcttgcc acatcataaa aaaagt 156

<210> 10
 <211> 777
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mảnh loại bỏ p2?2 của trình tự khởi đầu p2

<400> 10
 tgggttatcat gcagaggaac aaaaaagaaa aggataatta tatagctgaa acctaattgac 60
 gtgtagtctg ttaatagacc actaataatt aatattttca atctttgata acatcaaata 120
 aaaataccat ttattcctta tctataaaaa aggacacatt atcattatca cttacatgtg 180
 aaattataat aaactttttt acgtaatat ttagcaaadc ttacagcatt tttgattgga 240
 tttattttaag tatggtatat attaataaat atttaaccga taattataaa attttaaata 300

```

ttaatttact ttaaatttga catgtattat ctatattaat gtaccataaa ataggatgct 360
aaaatattaa tagtataaat tataaagcgt attttacatc aatataacta gatatttact 420
taaataatta tttgattaaa atttaacaac gtatccatta tatatggtca taattgtaga 480
aagaataaat aaccattgca attgaatatt gcaaaagatg attgaaaatg tatgtggtgt 540
catagtgatg agatacgttg ataatgggat tggattagga catccaaaag aaaagcttct 600
ttgatttgcc acaagttcac atcccgtgag actacagttt ggttgaacaa taatctcaac 660
acccgacagg acccaaagca aattcagggg tcacggacta ctctccacca aacttttctc 720
cattcattcc tctataaata acaatctctg ggtagcttgc cacatcataa aaaaagt 777

```

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

<220>
 <223> trình tự mỗi xuôi để nhân SEQ ID NO: 9

<400> 11
 tcccgtgaga ctacagtttg g 21

<210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mỗi ngược mô tả để nhân SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10

<400> 12
 ggtagcttgc cacatcataa aaaaagt 27

<210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự mỗi xuôi để nhân SEQ ID NO: 10

<400> 13
 tggttatcat gcagaggaa 19