

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến trình tự axit nucleic dùng để phát hiện cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 và phương pháp phát hiện sử dụng axit nucleic này, cụ thể là sáng chế đề cập đến cây đậu tương DBN9004 kháng glyphosat và glufosinat và phương pháp phát hiện liệu một phân tử ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 cụ thể có trong mẫu sinh học hay không.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

N-phosphonometylglyxin, cũng được biết đến là glyphosat, là một thuốc diệt cỏ không chọn lọc phổ rộng kinh điển chuyển đoạn hệ thống. Glyphosat là một chất ức chế axit phosphoenolpyruvic (PEP) cạnh tranh, một cơ chất tổng hợp của 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat syntaza (EPSPS), và có thể ức chế sự chuyển hóa của hai cơ chất PEP và 3-phosphoshikimat thành 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphoshikimat được xúc tác bởi EPSPS, nhờ đó phong bế con đường tổng hợp axit shikimic, một tiền chất tổng hợp của axit amin thơm, và dẫn đến làm chết cỏ và vi khuẩn do can thiệp vào quá trình tổng hợp protein.

Tính kháng glyphosat có thể có được bằng cách biểu hiện *EPSPS* cải biến. *EPSPS* cải biến có ái lực với glyphosat thấp, và vì thế khi có mặt glyphosat, *EPSPS* vẫn giữ được hoạt tính xúc tác của nó, tức là, tạo ra tính kháng glyphosat.

Đậu tương (*Glyxn max*) là một trong số năm cây trồng chính trên thế giới.

Tính kháng thuốc diệt cỏ, đặc biệt là tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat, là một tính trạng nông học quan trọng đối với sản lượng đậu tương. Tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat ở cây đậu tương có thể đạt được bằng các phương pháp chuyển gen để biểu hiện các gen kháng thuốc diệt cỏ glyphosat (*EPSPS*, *CP4*) ở cây đậu tương như sự kiện đậu tương GTS40-3-2, và sự kiện đậu tương MON89788.

Trong những năm gần đây, việc chấp nhận rộng rãi các hệ thống canh tác kháng glyphosat và việc gia tăng sử dụng glyphosat đã dẫn đến việc cỏ kháng glyphosat ngày càng phổ biến. Ở các khu vực nơi mà những người canh tác phải đối mặt với tình trạng cỏ kháng glyphosat hoặc cỏ biến đổi thành loại cỏ khó kiểm soát hơn, thì những người canh tác có thể giải quyết tình trạng hiệu quả kém của glyphosat bằng cách kết hợp với hoặc thay thế loại thuốc diệt cỏ này bằng các loại thuốc diệt cỏ khác có khả năng kiểm soát cỏ không bị tác dụng bởi thuốc diệt cỏ glyphosat.

Glufosinat là một loại thuốc diệt cỏ không hệ thống và không có tính chọn lọc trong số các thuốc diệt cỏ phosphinothrixin. Nó được sử dụng chủ yếu để kiểm soát cỏ có lá rộng hoặc cỏ hàng năm có quanh năm một khi chúng xuất hiện, và việc kiểm soát cỏ dại được thực hiện bằng cách ức chế hoàn toàn L-phosphonomyxin (một thành phần có hoạt tính trong glufosinat) trên glutamin synthaza (một enzym cần thiết cho việc giải độc tổ amoniac ở cỏ). Khác với glyphosat có thể làm chết rễ của cỏ, thì glufosinat có thể làm chết lá trước tiên và dịch chuyển trong xylen của cỏ bằng cách thoát hơi nước, và đặc tính tác dụng nhanh của nó nằm giữa paraquat và glyphosat.

L-phosphinothrixin được chuyển hóa thành dạng không có hoạt tính bằng cách axetyl hóa có xúc tác của phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) được phân lập từ *Streptomyces*. Các gen biểu hiện các dạng được tối ưu hóa của

PAT ở thực vật đã được sử dụng ở cây đậu tương để truyền đặc tính kháng thuốc diệt cỏ glufosinat cho cây đậu tương như sự kiện đậu tương A5547-127. Do đó, việc sử dụng thuốc diệt cỏ glufosinat kết hợp với các tính trạng kháng glufosinat có thể dùng làm công cụ không có tính chọn lọc để kiểm soát cỏ kháng glyphosat một cách hiệu quả.

Trong tương lai, với sự phổ biến của các cây đậu tương chuyển gen kháng côn trùng và việc canh tác chúng trên quy mô lớn, thì một số lượng nhỏ các loài côn trùng/vật gây hại sống sót có thể làm nảy sinh tính kháng thuốc sau một vài đợt nhân giống. Việc đồng canh tác các cây đậu tương chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ như các cây đậu tương chuyển gen không kháng côn trùng với các cây đậu tương chuyển gen kháng côn trùng theo một tỷ lệ có thể làm chậm sự xuất hiện tính kháng côn trùng/vật gây hại.

Đã biết rằng sự biểu hiện của các gen ngoại lai ở thực vật bị ảnh hưởng bởi vị trí nhiễm sắc thể của chúng, mà có thể do trạng thái gần của các cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ, dị nhiễm sắc) hoặc các yếu tố điều hòa phiên mã (ví dụ, các yếu tố tăng cường) với vị trí kết hợp. Cuối cùng, thường cần sàng lọc một số lượng lớn các sự kiện trước khi có thể xác định được các sự kiện mà có thể được thương mại hóa (tức là, các sự kiện mà các gen đích được đưa vào có thể được biểu hiện tối ưu). Ví dụ, đã quan sát thấy ở thực vật và các vi sinh vật khác rằng có thể có sự khác biệt lớn về mức biểu hiện của các gen được đưa vào giữa các sự kiện; cũng có sự khác biệt về kiểu biểu hiện cả về không gian và thời gian, như sự khác biệt về sự biểu hiện tương đối của các gen chuyển trong số các mô thực vật khác nhau, sự khác biệt này được bộc lộ bởi một thực tế là kiểu biểu hiện thực tế có thể không phù hợp với kiểu biểu hiện được kỳ vọng theo các yếu tố điều hòa phiên mã trong các cấu trúc gen được đưa vào. Do đó, nói chung cần phải tạo ra hàng trăm các sự kiện khác nhau và để sàng lọc ra

được một sự kiện với mức biểu hiện và kiểu biểu hiện của gen chuyển mà được dự tính để thương mại hóa các sự kiện này. Các sự kiện với kiểu biểu hiện và mức biểu hiện gen chuyển được kỳ vọng có thể được sử dụng để đưa các gen chuyển vào các nền di truyền khác bằng cách lai hữu tính khác kiểu sử dụng các phương pháp nhân giống thông thường. Các thế hệ con được tạo ra bởi phương pháp lai này giữ lại được các đặc tính biểu hiện của gen chuyển của các tế bào biến nạp gốc. Việc áp dụng kiểu chiến lược này có thể đảm bảo sự biểu hiện gen một cách chắc chắn ở nhiều giống, và các giống này có thể thích ứng tốt với các điều kiện canh tác ở địa phương.

Có lợi là sự có mặt của một sự kiện cụ thể có thể được phát hiện để xác định xem liệu các cây con thu được từ quá trình lai hữu tính có chứa các gen đích hay không. Ngoài ra, các phương pháp để phát hiện các sự kiện cụ thể cũng sẽ giúp tuân thủ các quy định có liên quan, ví dụ, sự phê duyệt chính thức và dán nhãn các sản phẩm thực phẩm thu được từ các cây trồng tái tổ hợp là cần thiết trước khi chúng được đưa ra thị trường. Có thể phát hiện sự có mặt của các gen chuyển bằng phương pháp phát hiện polynucleotit đã biết rõ bất kỳ, ví dụ, các phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR) hoặc lai ADN sử dụng mẫu dò polynucleotit. Các phương pháp phát hiện này thường tập trung vào các yếu tố di truyền chung như trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc, và các gen chỉ thị. Do đó, trừ khi trình tự của ADN nhiễm sắc thể (“ADN liền kề”) bên cạnh ADN chuyển gen được cài vào là đã biết, các phương pháp như vậy trên đây có thể sẽ không phân biệt được các sự kiện khác nhau, đặc biệt là các sự kiện được tạo ra với cùng một cấu trúc ADN. Do đó, một cặp môi mà nối vào vị trí tiếp hợp của gen chuyển được cài vào và ADN liền kề, cụ thể là, đoạn môi thứ nhất chứa trình tự liền kề thứ nhất và đoạn môi thứ hai chứa trình tự được cài vào, thường được sử dụng để xác định các sự kiện chuyển gen cụ thể bằng

PCR theo phương pháp hiện nay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất trình tự axit nucleic dùng để phát hiện cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 và phương pháp phát hiện sử dụng trình tự này, sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat tốt hơn, và phương pháp phát hiện này có thể xác định nhanh và chính xác liệu một phân tử ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen cụ thể DBN9004 có trong mẫu sinh học hay không.

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

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

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

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

SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có chiều dài gồm 22 nucleotit nằm ở đầu 5' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, và SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó nối trình tự ADN bộ gen liền kề của vị trí cài ở đậu tương và trình tự ADN ở đầu 5' của trình tự được cài vào; do đó việc bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được xác định là sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có chiều dài gồm 22 nucleotit ở đầu 3' của trình tự được cài vào gần vị

trí cài tiếp hợp trong sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004, và SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó nối trình tự ADN ở đầu 3' của trình tự được cài vào và trình tự ADN bộ gen liền kề của vị trí cài ở đầu tương; do đó việc bao gồm SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được xác định là sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004.

Theo sáng chế, trình tự axit nucleic có thể bao gồm ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 polynucleotit liên tiếp (trình tự axit nucleic thứ nhất) của một phần bất kỳ của trình tự chuyển gen được cài vào trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 polynucleotit liên tiếp (trình tự axit nucleic thứ hai) của phần bất kỳ của vùng ADN bộ gen của đầu tương liền kề ở đầu 5' trong SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó. Trình tự axit nucleic có thể còn là một phần tương đồng với hoặc bổ sung với SEQ ID NO: 3 bao gồm SEQ ID NO: 1 nguyên vẹn. Nếu trình tự axit nucleic thứ nhất và trình tự axit nucleic thứ hai được sử dụng cùng nhau, thì các trình tự axit nucleic này đóng vai trò là cặp mẫu ADN có thể được sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra sản phẩm khuếch đại. Sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 hoặc thể hệ con của nó có thể được phát hiện nếu sản phẩm khuếch đại thu được trong phương pháp khuếch đại ADN sử dụng cặp mẫu ADN là một sản phẩm khuếch đại bao gồm SEQ ID NO: 1. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết rõ rằng các trình tự axit nucleic thứ nhất và thứ hai là không nhất thiết chỉ bao gồm ADN, mà cũng có thể bao gồm ARN, hỗn hợp ADN và ARN, hoặc hỗn hợp gồm ADN, ARN, hoặc nucleotit khác hoặc dạng tương tự của chúng mà không đóng vai trò là các khuôn mẫu của một hoặc nhiều polymeraza. Hơn nữa, các mẫu dò hoặc các đoạn mẫu được mô tả trong sáng chế nên có độ dài gồm ít nhất khoảng 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 hoặc 22 nucleotit liên tiếp, mà có thể được

chọn từ các nucleotit được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5. Nếu được chọn từ các nucleotit được thể hiện dưới dạng SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, và SEQ ID NO: 5, thì các mẫu dò và các đoạn mồi có thể là các nucleotit liên tiếp có chiều dài gồm ít nhất 21 đến 50 hoặc nhiều hơn 50 nucleotit. SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có chiều dài gồm 1207 nucleotit nằm ở đầu 5' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, và SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó bao gồm trình tự ADN bộ gen liền kề của đậu tương gồm 740 nucleotit (nucleotit 1-740 của SEQ ID NO: 3), 74 nucleotit trong trình tự ADN của cấu trúc pDBN4003 (nucleotit 741-814 của SEQ ID NO: 3), trình tự kết thúc t35S gồm 195 nucleotit (nucleotit 815-1009 của SEQ ID NO: 3), trình tự đệm trong vector gồm 21 nucleotit (nucleotit 1010-1030 của SEQ ID NO: 3), và trình tự ADN ở đầu 5' của phosphinothrixin N-acetyltransferaza cPAT gồm 177 nucleotit (nucleotit 1031-1207 của SEQ ID NO: 3) (nucleotit 815-1207 của SEQ ID NO: 3); do đó việc bao gồm SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được xác định là sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004.

Trình tự axit nucleic có thể bao gồm ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 polynucleotit liên tiếp (trình tự axit nucleic thứ ba) của phần bất kỳ của trình tự chuyển gen được cài vào trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc ít nhất 11 hoặc nhiều hơn 11 polynucleotit liên tiếp (trình tự axit nucleic thứ 4) của phần bất kỳ của vùng ADN bộ gen của đậu tương liền kề ở đầu 3' trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó. Trình tự axit nucleic có thể còn là một phần tương đồng với hoặc bổ sung với SEQ ID NO: 4 chứa SEQ ID NO: 2 nguyên vẹn. Nếu trình tự axit nucleic thứ ba và trình tự axit nucleic thứ tư được sử dụng cùng nhau, thì các trình tự axit nucleic này đóng vai trò là cặp mồi ADN có thể được sử dụng trong phương pháp

khuếch đại ADN để tạo ra sản phẩm khuếch đại. Sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 hoặc thể hệ con của nó có thể được phát hiện khi sản phẩm khuếch đại thu được trong phương pháp khuếch đại ADN bằng cách sử dụng cặp mồi ADN là một sản phẩm khuếch đại chứa SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có chiều dài gồm 631 nucleotit ở đầu 3' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004, và SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó gồm trình tự khởi đầu prGm17gTsfl có 226 nucleotit (nucleotit 1-226 của SEQ ID NO: 4), 61 nucleotit trong trình tự ADN của cấu trúc pDBN4003 (nucleotit 227-287 của SEQ ID NO: 4), trình tự tiếp hợp gồm 6 nucleotit (nucleotit 288-293 của SEQ ID NO: 4) và trình tự ADN bộ gen liền kề của đầu tương gồm 338 nucleotit (nucleotit 294-631 của SEQ ID NO: 4); do đó việc bao gồm SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được xác định là sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004.

SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó là trình tự có chiều dài gồm 7059 nucleotit mà biểu thị sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004, cụ thể là các bộ gen và các yếu tố di truyền chứa trong đó được thể hiện trong bảng 1. Việc bao gồm SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được xác định là sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004.

Bảng 1. Các bộ gen và các yếu tố di truyền được chứa trong SEQ ID NO: 5

Yếu tố di truyền/bộ gen	Chiều dài (bp)	Vị trí nằm trên SEQ ID NO: 5
bộ gen ở đầu 5'	1268	1-1268
LB	74	1269-1342
t35S	195	1343-1537
cPAT	552	1559-2110
pr35s	530	2130-2659

tPse9	643	2708-3350
cEPSPS	1368	3393-4760
spAt CTP2	228	4761-4988
prGm17gTsf1	1012	4989-6000
RB	61	6001-6061
bộ gen ở đầu 3'	992	6068-7059

Trình tự axit nucleic hoặc các trình tự bổ sung của chúng có thể được sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra các đơn vị siêu sao chép, việc phát hiện ra các đơn vị siêu sao chép cho biết sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 hoặc các thể hệ con của chúng trong mẫu sinh học; và trình tự axit nucleic hoặc các trình tự bổ sung của chúng có thể được sử dụng trong các phương pháp phát hiện nucleotit để phát hiện sự có mặt của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 hoặc các thể hệ con của nó trong mẫu sinh học.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với ít nhất hai loại đoạn mồi để khuếch đại sản phẩm khuếch đại đích trong phản ứng khuếch đại axit nucleic;

thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic; và

phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại đích;

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

Hơn nữa, sản phẩm khuếch đại đích bao gồm các nucleotit liên tiếp ở các vị trí 1-11 hoặc các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của

nó, và/hoặc các nucleotit liên tiếp ở các vị trí 1-11 hoặc các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Ngoài ra, sản phẩm khuếch đại đích bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ: SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Trong các giải pháp kỹ thuật nêu trên, ít nhất một trong số các đoạn mỗi bao gồm trình tự axit nucleic hoặc một đoạn của nó, hoặc trình tự bổ sung với nó.

Cụ thể là, các đoạn mỗi bao gồm một đoạn mỗi thứ nhất và một đoạn mỗi thứ hai, trong đó đoạn mỗi thứ nhất được chọn từ SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 10; và đoạn mỗi thứ hai được chọn từ SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 11.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 trong một mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

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

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

phát hiện tình trạng lai giữa mẫu cần được phát hiện với mẫu dò.

Các điều kiện nghiêm ngặt có thể là tiến hành lai trong dung dịch gồm $6 \times$ SSC (natri xitrat) và 0,5% SDS (lauryl natri sulfat) ở nhiệt độ 65°C , sau đó rửa màng một lần bằng $2 \times$ SSC, 0,1% SDS, và $1 \times$ SSC, 0,1% SDS, tương ứng.

Hơn nữa, mẫu dò bao gồm các nucleotit liên tiếp ở các vị trí 1-11 hoặc các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc các

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

Ngoài ra, mẫu dò bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ: SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Tùy ý, ít nhất một trong số các mẫu dò được đánh dấu bằng ít nhất một chất huỳnh quang.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

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

lai mẫu cần được phát hiện với phân tử axit nucleic chỉ thị trong các điều kiện lai nghiêm ngặt; và

phát hiện hiện tượng lai giữa mẫu cần được phát hiện với phân tử axit nucleic chỉ thị, và còn xác định mối liên hệ về gen giữa tính kháng glyphosat và/hoặc tính kháng glufosinat và phân tử axit nucleic chỉ thị trong di truyền bằng cách phân tích việc nhân giống có trợ giúp của chỉ thị.

Hơn nữa, phân tử axit nucleic chỉ thị bao gồm các nucleotit liên tiếp ở các vị trí 1-11 hoặc các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc các nucleotit liên tiếp ở các vị trí 1-11 hoặc các vị trí 12-22 trong SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Cũng hơn nữa, phân tử axit nucleic chỉ thị bao gồm ít nhất một trình tự

được chọn từ: SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến kit phát hiện ADN, có ít nhất một phân tử ADN, trong đó phân tử ADN bao gồm ít nhất 11 nucleotit liên tiếp của trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc ít nhất 11 nucleotit liên tiếp của trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó, và có thể được dùng làm đoạn mồi ADN hoặc mẫu dò đặc hiệu với sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 hoặc thể hệ con của nó.

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

Ngoài ra, phân tử ADN bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ: trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và trình tự tương đồng của SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến một bộ phận hoặc tế bào thực vật, chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS kháng glyphosat, trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT kháng glufosinat, và trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu. Trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ: các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo

ra cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, bao gồm đưa trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS kháng glyphosat và/hoặc trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT kháng glufosinat, và trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu được chọn từ ít nhất một trình tự axit nucleic của các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 vào bộ gen của cây đậu tương.

Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat bao gồm các bước:

lai hữu tính cây đậu tương bố mẹ thứ nhất chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat với cây đậu tương bố mẹ thứ hai không có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat để tạo ra một lượng lớn các cây con;

xử lý các cây con bằng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat; và

chọn lọc cây con mà có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp canh tác cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

gieo ít nhất một hạt đậu tương, bộ gen của hạt đậu tương này chứa trình tự axit nucleic mã hóa protein EPSPS kháng glyphosat và/hoặc trình tự axit nucleic mã hóa protein PAT kháng glufosinat, và trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu;

để hạt đậu tương phát triển thành cây đậu tương; và

phun một liều hữu hiệu thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat lên cây đậu tương và thu hoạch cây với mức thiệt hại cây trồng giảm

so với các cây khác không mang trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu;

trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu được chọn từ ít nhất một trình tự axit nucleic trong số các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bảo vệ cây trồng không bị thiệt hại do thuốc trừ sâu gây ra, bao gồm phun thuốc diệt cỏ chứa một liều hữu hiệu của glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng để trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen, trong đó cây đậu tương chuyển gen chứa ít nhất một trình tự axit nucleic được chọn từ các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 trong bộ gen của nó, và cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ trên cánh đồng, bao gồm phun thuốc diệt cỏ chứa một liều hữu hiệu của glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng để trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen, trong đó cây đậu tương chuyển gen chứa ít nhất một trình tự axit nucleic được chọn từ các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 trong bộ gen của nó, và cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp kiểm soát cỏ kháng glyphosat trên cánh đồng đối với cây kháng glyphosat, bao gồm phun thuốc diệt cỏ chứa một lượng hữu hiệu glufosinat lên cánh đồng để trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat, trong đó cây đậu

tương chuyển gen kháng glyphosat chứa ít nhất một trình tự axit nucleic được chọn từ các trình tự được thể trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 trong bộ gen của nó, và cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng glyphosat có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glufosinat ở cùng thời điểm.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp làm chậm sự kháng thuốc của côn trùng, bao gồm trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat trên cánh đồng để trồng cây đậu tương có khả năng kháng côn trùng, trong đó cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat chứa ít nhất một trình tự axit nucleic được chọn từ các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 trong bộ gen của nó.

Để đạt được mục đích trên đây, sáng chế cũng đề cập đến hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp chứa polynucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp này là lecithin, axit béo, glyxerol, sterol, vẩy đậu tương, bột đậu tương, protein đậu tương hoặc sản phẩm cô của nó, dầu đậu nành, chất xơ protein đậu tương, cục sữa đậu tương hoặc chất đông tụ đậu tương.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Fig.1 thể hiện cấu trúc của vị trí tiếp hợp giữa trình tự chuyển gen được cài vào và bộ gen đậu tương theo trình tự axit nucleic dùng để phát hiện cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 và phương pháp phát hiện chúng theo sáng chế;

Fig.2 thể hiện cấu trúc của vector biểu hiện tái tổ hợp pDBN4003 theo trình tự axit nucleic dùng để phát hiện cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004

và phương pháp phát hiện chúng theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong trình tự axit nucleic để phát hiện cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 và phương pháp phát hiện chúng theo sáng chế, các định nghĩa dưới đây và các phương pháp có thể xác định sáng chế tốt hơn và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện sáng chế, và trừ khi được quy định theo cách khác, các thuật ngữ ở đây được hiểu theo cách dùng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Thuật ngữ “đậu tương” được dùng để chỉ *Glyxyn max* và bao gồm tất cả các loài thực vật mà có thể lai với đậu tương, kể cả các loài đậu tương kiểu dại.

Thuật ngữ “chứa” hoặc “bao gồm” được dùng để chỉ “bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở”.

Thuật ngữ “thực vật” bao gồm thực vật nguyên vẹn, tế bào thực vật, cơ quan của thực vật, tế bào trần của thực vật, nuôi cấy mô tế bào thực vật mà từ đó thực vật có thể được tái sinh, mô sẹo thực vật, bụi cây và tế bào thực vật nguyên vẹn thu được ở thực vật hoặc một bộ phận của thực vật như phôi, phần hoa, noãn, hạt, lá, hoa, cành, quả, thân, rễ, đầu rễ, và bao phần. Cần hiểu rằng một bộ phận của thực vật chuyển gen trong phạm vi sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào thực vật, tế bào trần, mô, mô sẹo, phôi và hoa, thân, quả, lá và rễ, và các bộ phận của thực vật trên đây có thể thu được từ các thực vật chuyển gen mà đã được biến nạp trước phân tử ADN theo sáng chế và do đó ít nhất một phần bao gồm các tế bào chuyển gen, hoặc các thế hệ con của chúng.

Thuật ngữ “gen” được dùng để chỉ một đoạn axit nucleic biểu hiện một protein cụ thể, bao gồm trình tự điều hòa (trình tự không mã hóa ở đầu 5') trước

trình tự mã hóa và trình tự điều hòa (trình tự không mã hóa ở đầu 3') sau trình tự mã hóa. Thuật ngữ “gen tự nhiên” được dùng để chỉ gen mà được phát hiện trong tự nhiên là có các trình tự điều hòa riêng của nó. Thuật ngữ “gen khảm” được dùng để chỉ gen bất kỳ mà không phải là gen tự nhiên, chứa các trình tự điều hòa và mã hóa không có nguồn gốc trong tự nhiên. Thuật ngữ “gen nội sinh” được dùng để chỉ gen tự nhiên mà nằm ở một vị trí tự nhiên trong bộ gen của sinh vật. Thuật ngữ “gen ngoại sinh” là một gen ngoại lai mà hiện có mặt trong bộ gen của sinh vật nhưng ban đầu không có mặt, và cũng được dùng để chỉ gen mà được đưa vào tế bào thụ thể thông qua các bước chuyển gen. Gen ngoại sinh có thể bao gồm gen tự nhiên hoặc gen khảm được đưa vào sinh vật không tự nhiên. Thuật ngữ “gen chuyển” là gen mà được đưa vào bộ gen thông qua quá trình biến nạp. Vị trí mà tại đó ADN tái tổ hợp được đưa vào bộ gen thực vật có thể được dùng để chỉ là ‘vị trí cài’ hoặc ‘vị trí đích’.

Thuật ngữ “ADN liên kết” có thể bao gồm bộ gen mà tồn tại tự nhiên trong, ví dụ, cơ quan thực vật hoặc ADN ngoại sinh (khác loại) được đưa vào thông qua quá trình biến nạp, như một đoạn có liên quan đến sự kiện biến nạp. Do đó, ADN liên kết có thể bao gồm một tổ hợp gồm các ADN tự nhiên và ngoại sinh. Theo sáng chế, thuật ngữ “vùng liên kết” hoặc “trình tự liên kết” hoặc “vùng ranh giới bộ gen” hoặc “trình tự ranh giới của bộ gen” được dùng để chỉ trình tự gồm ít nhất 3, 5, 10, 11, 15, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 1000, 1500, 2000, 2500, hoặc 5000 cặp bazơ hoặc trình tự dài hơn, mà nằm ở trình tự xuôi dòng hoặc ngược dòng của phân tử ADN ngoại sinh được cài vào ban đầu và liên kết với phân tử ADN ngoại sinh được cài vào ban đầu. Nếu vùng liên kết nằm ở trình tự xuôi dòng, cũng có thể được dùng để chỉ là “vùng liên kết ranh giới bên trái” hoặc “vùng liên kết với đầu 3'” hoặc “vùng ranh giới của bộ gen ở đầu 3'” hoặc “trình tự ranh giới ở đầu 3' của bộ gen”, và thuật ngữ tương tự. Nếu vùng liên

kề nằm ở trình tự ngược dòng, thì cũng có thể được dùng để chỉ là “vùng liền kề ranh giới bên phải” hoặc “vùng liền kề ở đầu 5’” hoặc “vùng ranh giới của bộ gen ở đầu 5’” hoặc “trình tự ranh giới ở đầu 5’ của bộ gen”, và thuật ngữ tương tự.

Quy trình biến nạp để kết hợp ngẫu nhiên ADN ngoại sinh sẽ thu được các tế bào biến nạp chứa các vùng liền kề khác nhau mà được bao gồm trong mỗi tế bào biến nạp một cách đặc hiệu. Nếu ADN tái tổ hợp được đưa vào cây trồng bằng cách lai thông thường, thì vùng liền kề của nó thường không bị thay đổi. Các tế bào biến nạp cũng sẽ chứa thể tiếp hợp duy nhất giữa ADN cài vào khác loài và một đoạn của ADN bộ gen hoặc giữa hai đoạn của ADN bộ gen hoặc giữa hai đoạn của các ADN khác loại. “Tiếp hợp” là điểm tại đó hai đoạn ADN đặc hiệu được liên kết với nhau. Ví dụ, sự tiếp hợp xảy ra ở vị trí mà ADN cài vào được liên kết với ADN liền kề. Các điểm tiếp hợp cũng có mặt trong các sinh vật đã biến nạp, trong đó hai đoạn ADN được liên kết với nhau theo cách mà được tìm thấy trong các sinh vật tự nhiên đã cải biến. “ADN tiếp hợp” hoặc “vùng tiếp hợp” được dùng để chỉ ADN chứa điểm tiếp hợp.

Sáng chế đề xuất sự kiện đậu tương chuyển gen được gọi là DBN9004 và các thế hệ con của chúng, sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 là cây đậu tương DBN9004 mà bao gồm các cây và hạt chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và các tế bào cây hoặc các phần có thể tái sinh của chúng. Các bộ phận cây chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tế bào, phần hoa, noãn, hoa, nụ, rễ, thân, lá, vỏ quả và các sản phẩm thu được từ cây đậu tương DBN9004 như bánh đậu tương, bột và dầu, cụ thể là lexitin, axit béo, glyxerol, sterol, dầu có thể ăn được, vảy đậu tương tương đã loại chất béo, bột đậu tương đã rang và đã loại chất béo, cục sữa đậu tương, bánh đậu, sản phẩm cô protein đậu tương, protein đậu tương được tách

ra, protein thực vật đã thủy phân, protein đậu tương đã chuẩn hóa và xơ protein đậu tương.

Sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 theo sáng chế chứa cấu trúc ADN, sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat khi cấu trúc ADN được biểu hiện trong các tế bào thực vật. Cấu trúc ADN gồm hai catxet biểu hiện liên tiếp, trong đó catxet biểu hiện thứ nhất chứa trình tự khởi đầu thích hợp và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp để biểu hiện ở thực vật, trình tự khởi đầu có thể được liên kết hoạt động với gen mã hóa 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS), và *EPSPS* có tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat. Catxet biểu hiện thứ hai chứa trình tự khởi đầu thích hợp và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp để biểu hiện ở thực vật, trình tự khởi đầu có thể được liên kết hoạt động với gen mã hóa phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT), và trình tự axit nucleic của protein PAT có tính kháng thuốc diệt cỏ glufosinat. Hơn nữa, trình tự khởi đầu này có thể là trình tự khởi đầu thích hợp được phân lập từ thực vật, bao gồm các trình tự khởi đầu cơ bản, dễ cảm ứng và/hoặc đặc hiệu mô, và trình tự khởi đầu thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự khởi đầu của virus khảm ở suplor (cauliflower mosaic virus-CaMV) 35S, trình tự khởi đầu của virus khảm ở cây huyền sâm (figwort mosaic virus-FMV) 35S, trình tự khởi đầu Tsfl, trình tự khởi đầu ubiquitin, trình tự khởi đầu actin, trình tự khởi đầu của nopalin synthaza *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), trình tự khởi đầu octopin synthaza (OCS), trình tự khởi đầu của virus gây xoắn lá và vàng lá ở họ Cà, trình tự khởi đầu Patatin, trình tự khởi đầu ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza/oxygenaza (RuBisCO), trình tự khởi đầu glutathion S-transferaza (GST), trình tự khởi đầu E9, trình tự khởi đầu GOS, trình tự khởi đầu alcA/alcR, trình tự khởi đầu RolD *Agrobacterium rhizogenes* và trình tự khởi

đầu *Arabidopsis* Suc2. Trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có thể là trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp mà đóng một vai trò ở thực vật, và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen nopalin synthaza *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ trình tự kết thúc của virus khảm ở suplor (CaMV) 35S và thu được từ trình tự kết thúc ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza/oxygenaza E9 của cây đậu Hà Lan, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen của chất ức chế proteaza II (PINII), và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen α -tubulin.

Ngoài ra, catxet biểu hiện cũng có thể bao gồm các yếu tố di truyền khác bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự tăng cường và các peptit tín hiệu/peptit chuyển tiếp. Trình tự tăng cường có thể tăng cường mức biểu hiện của gen, và trình tự tăng cường bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, yếu tố hoạt hóa dịch mã của virus gây bệnh ký axit ở thuốc lá (tobacco etch virus-TEV), trình tự tăng cường CaMV35S, và trình tự tăng cường FMV35S. Peptit tín hiệu/peptit chuyển tiếp có thể điều khiển protein EPSPS và/hoặc protein PAT được vận chuyển đến cơ quan hoặc bộ phận cụ thể nội bào hoặc ngoại bào, ví dụ, lục lạp được nhắm vào bằng cách sử dụng trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp của lục lạp, hoặc lưới nội chất được nhắm vào bằng cách sử dụng trình tự duy trì 'KDEL'.

Gen 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) có thể được phân lập từ chủng *Agrobacterium tumefaciens* CP4, và polynucleotit mã hóa EPSPS có thể được thay đổi bằng cách tối ưu hóa các codon hoặc bằng các cách khác nhằm đạt được mục đích làm tăng độ ổn định và lợi ích của các bản sao trong các tế bào đã biến nạp. Gen 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) cũng có thể được sử dụng làm gen chỉ thị chọn lọc.

Thuật ngữ “glyphosat” được dùng để chỉ N-phosphonomethylglyxin và các muối của nó. Xử lý bằng “thuốc diệt cỏ glyphosat” được dùng để chỉ việc tiến hành xử lý bằng chế phẩm diệt cỏ chứa glyphosat bất kỳ. Việc lựa chọn tỷ lệ sử dụng của chế phẩm glyphosat nhất định để đạt được liều hữu hiệu về mặt sinh học sẽ không vượt quá kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc xử lý cánh đồng có các nguyên liệu thực vật thu được từ cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 sử dụng chế phẩm diệt cỏ chứa glyphosat bất kỳ sẽ kiểm soát được sự phát triển của cỏ dại trên cánh đồng và sẽ không làm ảnh hưởng đến sự phát triển hay năng suất của các nguyên liệu thực vật thu được từ cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004.

Gen phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) phân lập từ *Streptomyces viridochromogenes* xúc tác cho sự chuyển hóa của L-phosphinothrixin thành dạng không có hoạt tính bằng cách axetyl hóa để tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ glufosinat ở cây trồng. Phosphinothrixin (PTC, axit 2-amino-4-metylphosphonobutyric) là một chất ức chế glutamin synthetaza. PTC là một đơn vị cấu trúc của chất kháng sinh 2-amino-4-metylphosphono-alanyl-alanine, tripeptit (PTT) này có hoạt tính chống lại vi khuẩn gram âm và gram dương và nấm, *Botrytis cinerea*. Gen phosphinothrixin N-axetyltransferaza (PAT) cũng có thể được dùng làm gen chỉ thị chọn lọc.

“Glufosinat” (cũng được biết đến là phosphinothrixin) được dùng để chỉ là amoni 2-amino-4-[hydroxy(metyl)phosphonyl]butyrat. Việc xử lý bằng “thuốc diệt cỏ glufosinat” được dùng để chỉ việc tiến hành xử lý bằng chế phẩm diệt cỏ chứa glufosinat bất kỳ. Việc chọn tỷ lệ sử dụng của chế phẩm glufosinat nhất định để thu được liều hữu hiệu về mặt sinh học sẽ không vượt quá khả năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Việc xử lý cánh đồng

bao gồm các nguyên liệu thực vật thu được từ cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 sử dụng chế phẩm diệt cỏ chứa glufosinat bất kỳ sẽ kiểm soát được sự phát triển của cỏ dại trên cánh đồng và sẽ không làm ảnh hưởng đến sự phát triển hoặc năng suất của các nguyên liệu thực vật thu được từ cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004.

Cấu trúc ADN được đưa vào cây trồng sử dụng phương pháp biến nạp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, biến nạp bằng súng bắn gen và biến nạp thông qua con đường ống phấn.

Phương pháp biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* là một phương pháp phổ biến để biến nạp ở thực vật. ADN ngoại sinh cần đưa vào cây trồng được tách dòng giữa các trình tự liên ứng ranh giới trái và phải của vector, tức là, vùng T-ADN. Tế bào *Agrobacterium* được biến nạp vector này, và sau đó được sử dụng để gây nhiễm vào mô thực vật, và vùng T-ADN của vector này chứa ADN ngoại sinh được cài vào bộ gen của thực vật.

Phương pháp biến nạp bằng súng bắn gen là phương pháp sử dụng chất mang chứa ADN ngoại sinh để bắn phá tế bào thực vật (biến nạp bằng đạn sinh học qua trung gian hạt).

Biến nạp bằng con đường ống phấn là phương pháp mang ADN ngoại sinh vào túi phôi thông qua con đường phôi tâm sử dụng con đường ống phấn tự nhiên (cũng được gọi là mô dẫn ống phấn) được tạo ra bởi hiện tượng thụ phấn ở thực vật.

Sau khi biến nạp, các cây chuyển gen phải được tái sinh từ mô thực vật đã biến nạp, và các thể hệ con có ADN ngoại sinh được chọn bằng cách sử dụng các chỉ thị thích hợp.

Cấu trúc ADN là một tổ hợp gồm các phân tử ADN mà được liên kết với nhau, và tổ hợp này tạo ra một hoặc nhiều catxet biểu hiện. Tốt hơn là, cấu trúc

ADN là một plasmid có khả năng tự tái bản trong tế bào vi khuẩn và chứa các vị trí enzym giới hạn khác nhau, và các vị trí enzym giới hạn chứa trong đó được sử dụng để đưa các phân tử ADN mang các yếu tố gen chức năng vào, tức là, trình tự khởi đầu, intron, trình tự dẫn, trình tự mã hóa, trình tự kết thúc ở đầu 3', và các trình tự khác. Catxet biểu hiện chứa trong cấu trúc ADN bao gồm các yếu tố gen mà cần để thực hiện sự phiên mã của ARN thông tin, và catxet biểu hiện có thể được thiết kế để biểu hiện trong các tế bào chưa có nhân hoặc các tế bào nhân thực. Catxet biểu hiện theo sáng chế được thiết kế sao cho được biểu hiện tốt nhất trong các tế bào thực vật.

“Sự kiện” chuyển gen được tạo ra bằng cách biến nạp cấu trúc ADN khác loại vào tế bào thực vật, tức là, bao gồm tạo ra quần thể cây trồng bằng cách đưa catxet biểu hiện axit nucleic chứa gen đích vào bộ gen thực vật bằng các phương pháp chuyển gen, tái sinh quần thể cây trồng, và chọn lọc cây cụ thể có các đặc tính của các vị trí bộ gen đặc hiệu được đưa vào. Thuật ngữ “sự kiện” bao gồm tế bào biến nạp ban đầu chứa ADN khác loại và các thế hệ con của tế bào biến nạp này. Thuật ngữ “sự kiện” cũng bao gồm các thế hệ con được tạo ra bằng cách lai hữu tính giữa tế bào biến nạp và một cá thể của các loài khác chứa ADN khác loại, thậm chí ngay cả sau khi lai ngược lại với các cây bố mẹ lai ngược, thì ADN được đưa vào và ADN bộ gen liên kề từ các cây bố mẹ biến nạp cũng có mặt ở cùng một vị trí nhiễm sắc thể ở thế hệ con lai. Thuật ngữ “sự kiện” cũng được dùng để chỉ là trình tự ADN từ tế bào biến nạp ban đầu, trình tự ADN bao gồm ADN được cài vào và trình tự bộ gen liên kề mà nằm sát với ADN được cài vào, và được cho là được truyền sang thế hệ con mà được tạo ra bằng cách lai hữu tính dòng bố mẹ mang ADN được cài vào (ví dụ, tế bào biến nạp ban đầu và thế hệ con của chúng được tạo ra bằng cách tự thụ phấn) với dòng bố mẹ không có ADN được cài vào, và thế hệ con sẽ nhận được ADN

được cài vào chứa gen đích.

“Tái tổ hợp” theo sáng chế được dùng để chỉ các dạng ADN và/hoặc protein và/hoặc sinh vật mà thường không được tìm thấy trong tự nhiên và do đó được tạo ra bằng cách can thiệp nhân tạo. Can thiệp nhân tạo như vậy có thể tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp và/hoặc các cây tái tổ hợp. “Phân tử ADN tái tổ hợp” được tạo ra bằng cách kết hợp nhân tạo hai đoạn trình tự được phân lập ở các trường hợp khác, như các đoạn axit nucleic được tổng hợp hóa học hoặc được phân lập bằng các kỹ thuật thao tác di truyền. Các kỹ thuật để thực hiện các thao tác trên axit nucleic là đã biết rõ.

Thuật ngữ “gen chuyển” bao gồm tế bào, dòng tế bào, mô sẹo, một bộ phận của cây trồng hoặc cây trồng bất kỳ, các kiểu gen của chúng sẽ khác nhau do sự có mặt của axit nucleic khác loại, và vì thế gen chuyển chứa thể chuyển gen được thay đổi ban đầu, và từng thế hệ con thu được từ các thể chuyển gen ban đầu bằng cách lai hữu tính hoặc tái sinh hữu tính. Theo sáng chế, thuật ngữ “gen chuyển” không bao gồm các biến đổi của bộ gen (nhiễm sắc thể hoặc ngoại nhiễm sắc thể) được gây ra bởi các phương pháp gây giống cây trồng thông thường hoặc các sự kiện có nguồn gốc trong tự nhiên, và các sự kiện có nguồn gốc trong tự nhiên là ví dụ, thụ phấn chéo ngẫu nhiên, lây nhiễm virus không tái tổ hợp, biến nạp bằng vi khuẩn không tái tổ hợp, chuyển vị không tái tổ hợp hoặc đột biến tự phát.

Theo sáng chế, “khác loài” được dùng để chỉ phân tử thứ nhất thường không được tìm thấy trong tự nhiên được kết hợp với một phân tử thứ hai. Ví dụ, một phân tử có thể có nguồn gốc từ loài thứ nhất và được cài vào bộ gen của loài thứ hai. Do đó, phân tử này là khác loài so với tế bào chủ và được đưa một cách nhân tạo vào bộ gen của tế bào chủ.

Việc trồng sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà kháng thuốc diệt

cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat được thực hiện bằng các bước sau: đầu tiên, lai hữu tính cây đậu tương bố mẹ thứ nhất với cây đậu tương bố mẹ thứ hai để tạo ra thế hệ cây con thứ nhất đa dạng, trong đó cây đậu tương bố mẹ thứ nhất bao gồm các cây đậu tương mà được trồng từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và các cây con của nó được tạo ra bằng cách biến nạp catxet biểu hiện theo sáng chế có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat, và cây đậu tương bố mẹ thứ hai không có tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat; sau đó chọn lọc các cây con mà chịu được việc phun thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, sau đó trồng cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat. Các bước này có thể còn bao gồm lai ngược cây con có khả năng chịu được việc phun thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat với cây đậu tương bố mẹ thứ hai hoặc cây đậu tương bố mẹ thứ ba, sau đó chọn lọc các cây con bằng cách phun thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat, hoặc bằng cách xác định các chỉ thị phân tử (như phân tử ADN có vị trí tiếp hợp được xác định ở đầu 5' và đầu 3' của trình tự được cài trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004) có liên quan đến các tính trạng, nhờ đó tạo ra cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat.

Cũng cần hiểu rằng hai cây chuyển gen khác nhau cũng có thể được lai với nhau để tạo ra các thế hệ con chứa hai gen ngoại lai độc lập, được bổ sung riêng rẽ. Các cây con mà là các đồng hợp tử đối với hai gen ngoại lai bổ sung có thể được tạo ra nhờ tự lai một cây con thích hợp. Việc lai ngược của các cây bố mẹ và thụ phấn chéo với các cây không chuyển gen như được mô tả trên đây cũng có thể được kỳ vọng, và sinh sản hữu tính cũng vậy.

Các cây đậu tương chuyển gen *Bt* có thể giết chết, ví dụ, các côn trùng/loài gây hại thuộc bộ cánh vảy, nhưng cũng có thể có một số ít các côn trùng/loài

gây hại sống sót mà, sau một vài thế hệ nhân giống, có thể tạo ra các côn trùng/loài gây hại kháng protein Bt. Để giải quyết vấn đề kháng của côn trùng/loài gây hại này, cơ quan bảo vệ môi trường của Mỹ đã đưa ra hướng dẫn về việc sử dụng các cây trồng chuyển gen, tức là, một tỷ lệ các cây đậu tương ản nâu (mà có thể là các cây đậu tương chuyển gen không có khả năng kháng côn trùng (mà có thể là cây đậu tương chuyển gen không có khả năng kháng loài gây hại (ví dụ, các cây đậu tương chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ, hoặc cây đậu tương chuyển gen không có khả năng kháng loài gây hại đích, hoặc cây đậu tương không chuyển gen)) cần được tạo ra. Nếu hầu hết các côn trùng/loài gây hại bị giết chết trên các cây đậu tương chuyển gen kháng côn trùng tương ứng, thì tỷ lệ các côn trùng/loài gây hại không bị giết trên các cây đậu tương ản nâu, mà đảm bảo rằng số quần thể côn trùng/loài gây hại mà không có tính kháng là chiếm ưu thế. Vì thế, ngay cả khi một lượng nhỏ các côn trùng/loài gây hại có tính kháng sống sót được, thì các gen kháng được giảm bớt đáng kể sau khi giao phối các côn trùng/loài gây hại có tính kháng này với một số lượng lớn các côn trùng/loài gây hại không có tính kháng.

Thuật ngữ “mẫu dò” dùng để chỉ một phân tử axit nucleic phân lập mà gắn kết với phân tử đánh dấu để phát hiện thông thường hoặc phân tử báo cáo trên đó, ví dụ, đồng vị phóng xạ, phôi tử, chất phát quang hóa học hoặc enzym. Mẫu dò như vậy bổ sung với một mạch của axit nucleic đích. Theo sáng chế, mẫu dò này bổ sung với một mạch ADN thu được từ bộ gen của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, bất kể ADN bộ gen thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 hay hạt của chúng hoặc thu được từ cây hoặc hạt hoặc chiết phẩm chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Mẫu dò theo sáng chế không chỉ bao gồm axit deoxyribonucleic hay axit ribonucleic mà còn bao gồm cả polyamit và các mẫu dò khác mà gắn kết đặc hiệu với trình tự ADN

đích và có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của trình tự ADN đích.

Thuật ngữ “đoạn mồi” là một phân tử axit nucleic phân lập mà gắn kết với mạch ADN đích bổ sung bằng cách lai và bắt cặp axit nucleic, tạo thành phân tử lai giữa đoạn mồi và mạch ADN đích, sau đó kéo dài dọc mạch ADN đích dưới tác động của polymeraza (ví dụ, ADN polymeraza). Cặp mồi theo sáng chế có liên quan đến ứng dụng của chúng trong việc khuếch đại các trình tự axit nucleic đích, ví dụ, bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR) hoặc các phương pháp khuếch đại axit nucleic thông thường khác.

Chiều dài của mẫu dò và đoạn mồi thường bao gồm 11 polynucleotit hoặc nhiều hơn, tốt hơn là 18 polynucleotit hoặc nhiều hơn, tốt hơn nữa là 24 polynucleotit hoặc nhiều hơn, và tốt nhất là 30 polynucleotit hoặc nhiều hơn. Mẫu dò và đoạn mồi như vậy được lai đặc hiệu với trình tự đích trong các điều kiện lai cực kỳ nghiêm ngặt. Mặc dù các mẫu dò khác với các trình tự ADN đích và duy trì khả năng lai với các trình tự ADN đích có thể được thiết kế bằng các phương pháp thông thường, song được ưu tiên rằng các mẫu dò và đoạn mồi theo sáng chế có mức đồng nhất trình tự ADN hoàn toàn với các trình tự axit nucleic liên tiếp của các axit nucleic đích.

Các đoạn mồi và các mẫu dò của các trình tự cài và ADN bộ gen liền kề theo sáng chế có thể được xác định bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, bằng cách phân lập phân tử ADN tương ứng từ các nguyên liệu thực vật thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và xác định trình tự axit nucleic của phân tử ADN. Phân tử ADN chứa trình tự cài chuyển gen và trình tự liền kề của bộ gen đậu tương, và một đoạn phân tử ADN có thể được sử dụng làm đoạn mồi hoặc mẫu dò.

Các mẫu dò và các đoạn mồi của axit nucleic theo sáng chế lai với trình tự

ADN đích trong các điều kiện nghiêm ngặt. Phương pháp khuếch đại hoặc lai axit nucleic thông thường có thể được sử dụng để xác định sự có mặt của ADN thu được từ sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004 trong một mẫu. Phân tử axit nucleic hoặc một đoạn của nó có thể lai đặc hiệu với các phân tử axit nucleic khác trong các điều kiện nhất định. Như được sử dụng trong sáng chế, nếu hai phân tử axit nucleic có thể tạo thành cấu trúc axit nucleic mạch kép đối song song, thì nó có thể được coi là hai phân tử axit nucleic này lai đặc hiệu với nhau. Nếu hai phân tử axit nucleic có khả năng bổ sung hoàn toàn, thì một phân tử axit nucleic trong số hai phân tử này được cho là “phân tử bổ sung” của phân tử axit nucleic còn lại. Như được sử dụng trong sáng chế, nếu mỗi nucleotit của phân tử axit nucleic bổ sung với nucleotit tương ứng của phân tử axit nucleic khác, thì hai phân tử axit nucleic này được cho là có “mức bổ sung hoàn toàn”. Nếu hai phân tử axit nucleic có thể được lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng bắt cặp và gắn kết với nhau ít nhất là trong các điều kiện “nghiêm ngặt kém” thông thường, thì hai phân tử axit nucleic này được cho là “bổ sung ở mức tối thiểu”. Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai với nhau với độ ổn định đủ để cho phép chúng bắt cặp và gắn kết với nhau trong các điều kiện “rất nghiêm ngặt” thông thường, thì hai phân tử axit nucleic này được cho là “bổ sung với nhau”. Mức chênh lệch so với mức bổ sung hoàn toàn là được phép, miễn là mức chênh lệch này không hoàn toàn ngăn cản hai phân tử tạo thành cấu trúc mạch kép. Để làm cho phân tử axit nucleic hoạt động như một đoạn mồi hoặc mẫu dò, chỉ cần đảm bảo rằng phân tử này có mức bổ sung đủ trong trình tự của nó để cho phép cấu trúc mạch kép ổn định được tạo thành ở nồng độ muối và dung môi cụ thể được sử dụng.

Như được sử dụng trong sáng chế, trình tự gần như tương đương đồng là một đoạn của phân tử axit nucleic, trong đó phân tử axit nucleic có thể được lai

đặc hiệu với mạch bổ sung của một đoạn khác của phân tử axit nucleic được bắt cặp trong các điều kiện rất nghiêm ngặt. Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp mà thúc đẩy quá trình lai ADN là ví dụ xử lý bằng 6,0x natri clorua/natri xitrat (SSC) trong điều kiện nhiệt độ bằng khoảng 45°C, và sau đó rửa bằng 2,0× SSC trong điều kiện nhiệt độ bằng 50°C, các điều kiện này là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, nồng độ muối trong bước rửa có thể được chọn từ 2,0 x SSC ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện kém nghiêm ngặt, đến 0,2 x SSC ở nhiệt độ 50°C trong các điều kiện rất nghiêm ngặt. Ngoài ra, các điều kiện về nhiệt độ trong bước rửa có thể được tăng lên từ nhiệt độ môi trường bằng 22°C trong điều kiện kém nghiêm ngặt đến 65°C trong các điều kiện rất nghiêm ngặt. Cả điều kiện nhiệt độ và nồng độ muối đều có thể thay đổi được, hoặc một trong số chúng có thể không được thay đổi trong khi biến còn lại có thể được thay đổi. Tốt hơn là, phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được lai đặc hiệu trong các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, ví dụ, ở 2,0 x SSC và 65°C với một hoặc nhiều hơn một phân tử axit nucleic trong số SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ trong số các đoạn của trình tự nêu trên. Tốt hơn nữa là, phân tử axit nucleic theo sáng chế có thể được lai đặc hiệu trong các điều kiện rất nghiêm ngặt với một hoặc nhiều hơn một phân tử axit nucleic trong số SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ trong số các đoạn của các trình tự nêu trên. Theo sáng chế, phân tử axit nucleic chỉ thị được ưu tiên có SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ của các trình tự nêu trên. Phân tử axit nucleic chỉ thị được ưu tiên khác theo sáng chế có 80% đến

100%, hoặc 90% đến 100% trình tự đồng nhất với SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của chúng, hoặc đoạn bất kỳ của các trình tự nêu trên. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 có thể được sử dụng làm chỉ thị trong phương pháp nhân giống cây trồng để xác định các cây con thu được từ quá trình lai di truyền. Hiện tượng lai giữa mẫu dò với phân tử ADN đích có thể được phát hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, đánh dấu huỳnh quang, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, đánh dấu bằng kháng thể và đánh dấu bằng chất phát quang hóa học.

Đối với việc khuếch đại (ví dụ, bằng phản ứng PCR) trình tự axit nucleic đích sử dụng các đoạn mồi khuếch đại đặc hiệu, “các điều kiện nghiêm ngặt” được dùng để chỉ các điều kiện mà chỉ cho phép các đoạn mồi lai với trình tự axit nucleic đích trong phản ứng khuếch đại nhiệt ADN, với đoạn mồi của trình tự kiểu đại (hoặc trình tự bổ sung của nó) tương ứng với trình tự axit nucleic đích có khả năng liên kết với trình tự axit nucleic đích, và tốt hơn là cho phép tổng hợp sản phẩm khuếch đại duy nhất, tức là, đơn vị siêu sao chép.

Thuật ngữ “gắn kết đặc hiệu với (trình tự đích)” được dùng để chỉ việc lai mẫu dò hoặc đoạn mồi với trình tự đích trong một mẫu chứa trình tự đích trong các điều kiện lai nghiêm ngặt.

Như được sử dụng trong sáng chế, “ADN được khuếch đại” hoặc “đơn vị siêu sao chép” được dùng để chỉ sản phẩm khuếch đại axit nucleic của trình tự axit nucleic đích mà là một phần của khuôn mẫu axit nucleic. Ví dụ, để xác định liệu cây đậu tương có được tạo ra bằng cách lai hữu tính sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 theo sáng chế hay không hoặc liệu mẫu đậu tương thu được trên cánh đồng có chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 hay

không, hay liệu chiết phẩm đậu tương như bột thô, bột hoặc dầu đậu tương có chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 hay không, ADN được chiết từ mẫu mô của cây đậu tương hoặc dịch chiết của chúng có thể tạo ra các đơn vị siêu sao chép mà là dấu hiệu cho biết sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic sử dụng một cặp mồi. Cặp mồi này có thể bao gồm đoạn mồi thứ nhất thu được từ trình tự liên kề nằm cạnh vị trí cài ADN ngoại lai cần cài vào bộ gen của cây đậu tương và đoạn mồi thứ hai thu được từ ADN ngoại lai cần cài. Đơn vị siêu sao chép có chiều dài và trình tự mà cũng là dấu hiệu để nhận biết sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Khoảng chiều dài của đơn vị siêu sao chép có thể là chiều dài liên kết của cặp mồi cộng thêm một cặp bazơ nucleotit, tốt hơn là cộng thêm 50 cặp bazơ nucleotit, tốt hơn nữa là cộng thêm 250 cặp bazơ nucleotit, tốt nhất là cộng thêm 450 cặp bazơ nucleotit hoặc nhiều hơn.

Tùy ý, cặp mồi này có thể thu được từ các trình tự bộ gen liên kề trên cả hai phía của ADN cần cài vào để tạo ra đơn vị siêu sao chép chứa toàn bộ trình tự nucleotit cần cài. Một cặp mồi thu được từ trình tự bộ gen của cây đậu tương có thể nằm cách xa trình tự ADN cần cài, và khoảng cách xa này có thể nằm trong khoảng từ một cặp bazơ nucleotit đến khoảng 20.000 cặp bazơ nucleotit. Sử dụng thuật ngữ “đơn vị siêu sao chép” đặc biệt loại trừ các đoạn mồi dạng dime được tạo ra trong phản ứng khuếch đại nhiệt ADN.

Phản ứng khuếch đại axit nucleic có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp khuếch đại axit nucleic đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, kể cả phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR). Nhiều phương pháp khuếch đại axit nucleic là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp khuếch đại PCR đã được triển khai để khuếch đại tối đa 22kb của ADN bộ gen và tối đa

42kb của ADN thực khuẩn thể. Các phương pháp này và các phương pháp khuếch đại ADN khác trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng trong sáng chế. Bộ gen của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng trình tự ADN ngoại lai cần được cài vào và trình tự ADN liền kề thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 với các trình tự đoạn nối được đề cập, và giải trình tự ADN chuẩn của đơn vị siêu sao chép PCR hoặc ADN được tách dòng có thể được tiến hành sau khi khuếch đại.

Kit phát hiện ADN dựa trên các phương pháp khuếch đại ADN chứa các phân tử mồi ADN mà lai đặc hiệu với ADN đích trong các điều kiện phản ứng thích hợp và khuếch đại các đơn vị siêu sao chép dấu hiệu. Kit có thể tạo ra phương pháp phát hiện dựa trên gel agarosa hoặc một số phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để phát hiện các đơn vị siêu sao chép dấu hiệu. Kit chứa đoạn mồi ADN mà tương đồng hoặc bổ sung với phần bất kỳ của vùng bộ gen của đậu tương nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 và tương đồng hoặc bổ sung với phần bất kỳ của vùng cài vào của gen chuyển nêu trong SEQ ID NO: 5 được đề xuất bởi sáng chế. Cụ thể là, SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 được xác định là cặp mồi hữu dụng trong phương pháp khuếch đại ADN, và khuếch đại đơn vị siêu sao chép dấu hiệu mà tương đồng với một phần của vùng bộ gen/gen chuyển ở đầu 5' của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, trong đó đơn vị siêu sao chép bao gồm SEQ ID NO: 1. Các phân tử ADN khác được sử dụng làm các đoạn mồi ADN có thể được chọn từ SEQ ID NO: 5.

Các đơn vị siêu sao chép được tạo ra bằng các phương pháp này có thể được phát hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau. Một trong số các phương pháp này là phân tích bit di truyền, trong đó mạch oligonucleotit ADN mà nối trình tự ADN cần cài và trình tự ADN bộ gen liền kề nằm cạnh được thiết kế. Mạch oligonucleotit được làm cố định trong các vi lỗ của đĩa vi lỗ, và sau khi

khuếch đại bằng phản ứng PCR vùng đích (sử dụng đoạn mồi cho mỗi trình tự cần cài và trình tự bộ gen liền kề nằm cạnh), sản phẩm PCR mạch đơn có thể được lai với mạch oligonucleotit đã cố định và có chức năng như một khuôn mẫu cho phản ứng kéo dài một bazơ mà sử dụng ADN polymeraza và ddNTP được đánh dấu đặc hiệu cho bazơ được kỳ vọng tiếp theo. Các kết quả có thể được thu thập bằng các phương pháp huỳnh quang hoặc phương pháp tương tự ELISA. Tín hiệu cho biết sự có mặt của trình tự được cài vào/trình tự liền kề, mà chứng tỏ là phản ứng khuếch đại, lai và kéo dài một bazơ là thành công.

Phương pháp khác là kỹ thuật giải trình tự bằng quy trình tổng hợp. Phương pháp này thiết kế một mạch oligonucleotit mà nối trình tự ADN cần cài và vị trí tiếp hợp ADN bộ gen nằm cạnh. Mạch oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR mạch đơn của vùng đích (sử dụng đoạn mồi cho mỗi trình tự trong số trình tự cần cài và trình tự bộ gen liền kề nằm cạnh), sau đó ủ với ADN polymeraza, ATP, sulfurylaza, luxiferaza, apyaza, adenosin-5'-phosphosulfat và luxiferin. dNTP được bổ sung tương ứng, và các tín hiệu quang tạo ra được đo. Tín hiệu quang cho biết sự có mặt của trình tự cài/trình tự liền kề, điều này chứng tỏ là phản ứng khuếch đại, lai và kéo dài một bazơ hoặc nhiều bazơ là thành công.

Hiện tượng phân cực huỳnh quang được bộc lộ bởi Chen và các đồng tác giả (Genome Res. 9: 492-498, 1999) cũng là một phương pháp mà có thể được sử dụng để phát hiện các đơn vị siêu sao chép theo sáng chế. Việc sử dụng phương pháp này đòi hỏi thiết kế một mạch oligonucleotit mà nối trình tự ADN cài vào và vị trí tiếp hợp ADN bộ gen nằm cạnh. Mạch oligonucleotit được lai với sản phẩm PCR mạch đơn của vùng đích (sử dụng đoạn mồi cho mỗi trình tự trong số trình tự cài vào và trình tự bộ gen liền kề nằm cạnh), sau đó ủ với ADN polymeraza, và ddNTP được đánh dấu huỳnh quang. Phản ứng kéo dài một

bazơ sẽ dẫn đến việc cài được ddNTP vào. Sự thay đổi về mức phân cực của việc cài này có thể được đo bằng cách sử dụng huỳnh quang kế. Sự thay đổi về mức phân cực chứng tỏ sự có mặt của trình tự cài/liền kề, mà chứng tỏ là phản ứng khuếch đại, lai, và phản ứng kéo dài một bazơ là thành công.

Taqman được mô tả như là một phương pháp để phát hiện và phân tích định lượng sự có mặt của trình tự ADN, và được mô tả chi tiết trong các hướng dẫn của nhà sản xuất. Hiện tại, phương pháp này được mô tả vắn tắt dưới đây, mẫu dò oligonucleotit FRET mà nối trình tự ADN cài vào và vị trí tiếp hợp liền kề nằm cạnh của bộ gen được thiết kế. Phản ứng kiểu vòng tròn được tiến hành bằng cách sử dụng mẫu dò FRET và các đoạn mồi PCR (sử dụng đoạn mồi cho mỗi trình tự trong số các trình tự cài vào và trình tự bộ gen liền kề nằm cạnh) khi có mặt polymeraza và dNTP ổn định nhiệt. Việc lai với mẫu dò FRET giúp phân cắt gốc huỳnh quang và gốc dập tắt trên mẫu dò FRET và giải phóng ra gốc huỳnh quang. Sự tạo thành tín hiệu huỳnh quang chứng tỏ sự có mặt của trình tự cài vào/liền kề, điều này chứng tỏ là phản ứng khuếch đại, lai là thành công.

Các kỹ thuật thích hợp để phát hiện các nguyên liệu thực vật thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 kháng thuốc diệt cỏ cũng có thể bao gồm lai thẩm tách Nam, lai tầm tách Bắc, và lai tại chỗ dựa trên nguyên tắc lai. Cụ thể là, kỹ thuật thích hợp bao gồm ủ mẫu dò và mẫu, rửa để loại bỏ mẫu dò không gắn kết và phát hiện liệu mẫu dò này đã lai hay chưa. Phương pháp phát hiện được mô tả trên đây tùy thuộc vào loại chỉ thị gắn với mẫu dò, ví dụ, mẫu dò được đánh dấu phóng xạ có thể được phát hiện bằng cách cho tiếp xúc và hiện ảnh màng bằng tia X, hoặc mẫu dò được đánh dấu enzym có thể được phát hiện nhờ sự thay đổi màu thông qua sự chuyển hóa cơ chất.

Tyangi và các đồng tác giả (Nat. Biotech. 14: 303-308, 1996) đã giới thiệu

việc áp dụng các chỉ thị phân tử trong việc phát hiện trình tự. Phương pháp này được mô tả ngắn gọn dưới đây, mẫu dò oligonucleotit FRET mà nối trình tự ADN cài vào và vị trí tiếp hợp liền kề nằm cạnh của bộ gen được thiết kế. Cấu trúc duy nhất của mẫu dò FRET tạo ra cấu trúc thứ cấp, cấu trúc này giữ cho gốc huỳnh quang và gốc dập tắt ở khoảng cách gần. Phản ứng kiểu vòng tròn được tiến hành bằng cách sử dụng mẫu dò FRET và các đoạn mồi PCR (sử dụng đoạn mồi cho mỗi trình tự trong số trình tự cài vào và trình tự bộ gen liền kề nằm cạnh) khi có mặt polymeraza và dNTP ổn định nhiệt. Sau khi khuếch đại PCR thành công, việc lai mẫu dò FRET và trình tự đích sẽ dẫn đến làm hao hụt cấu trúc thứ cấp của mẫu dò, để gốc huỳnh quang và gốc dập tắt được tách ra trong không gian để tạo ra tín hiệu huỳnh quang. Việc tạo ra tín hiệu huỳnh quang chứng tỏ sự có mặt của trình tự cài vào/trình tự liền kề, mà chứng tỏ là phản ứng khuếch đại và lai là thành công.

Các phương pháp được mô tả khác, như công nghệ vi lưu, cung cấp các phương pháp và thiết bị để phân lập và khuếch đại mẫu ADN. Các thuốc nhuộm huỳnh quang được sử dụng để phát hiện và xác định các phân tử ADN đặc hiệu. Thiết bị dạng ống nano gồm bộ cảm biến điện tử để phát hiện phân tử ADN hoặc các hạt nano mà phân tử ADN đặc hiệu gắn kết vào, do đó có thể được phát hiện, là hữu dụng để phát hiện phân tử ADN theo sáng chế.

Kit phát hiện ADN có thể được phát hiện bằng cách sử dụng các thành phần được mô tả theo sáng chế và các phương pháp được mô tả hoặc đã biết trong lĩnh vực phát hiện ADN. Kit này tạo điều kiện thuận lợi cho việc xác định sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong một mẫu và cũng có thể được sử dụng để canh tác các cây đậu tương chứa ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Kit này có thể chứa các đoạn mồi hoặc các mẫu dò ADN tương đồng hoặc bổ sung với ít nhất một phần của SEQ

ID NO: 1, 2, 3, 4 hoặc 5 hoặc chứa các đoạn môi hoặc các mẫu dò ADN khác tương đồng hoặc bổ sung với ADN chứa trong các yếu tố di truyền chuyển gen của ADN, và các trình tự ADN này có thể được sử dụng cho các phản ứng khuếch đại ADN hoặc làm các mẫu dò trong các phương pháp lai ADN. Cấu trúc ADN, chứa trong bộ gen của đậu tương, của vị trí tiếp hợp của trình tự chuyển gen được cài vào và bộ gen đậu tương được mô tả trong Fig.1 và bảng 1 chứa: vùng bộ gen liền kề của cây đậu tương DBN9004 nằm ở đầu 5' của trình tự chuyển gen được cài vào; một phần của trình tự cài vào từ vùng biên bên trái (left boundary-LB) của *Agrobacterium*; catxet biểu hiện thứ nhất bao gồm vùng khởi động từ virus khảm suplor 35S (pr35S) chứa một đoạn lặp nối tiếp của vùng tăng cường, mà có thể được liên kết hoạt động với phosphinothrixin N-axetyltransferaza kháng glufosinat (cPAT) của *Streptomyces* và sau đó được liên kết hoạt động với vùng kết thúc của virus khảm súp lơ 35S (t35S); catxet biểu hiện thứ hai chứa vùng khởi động (prGm17gTsfl) của gen Tsfl của đậu tương (mã hóa yếu tố kéo dài EF-1 α), mà có thể được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa (spAtCTP2) của peptit chuyển tiếp lục lục EPSPS *Arabidopsis*, sau đó được liên kết hoạt động với 5-enol-pyruvylshikimat-3-phosphat synthaza kháng glyphosat (cEPSPS) của chủng *Agrobacterium* CP4, và sau đó được liên kết hoạt động với trình tự không được dịch mã ở đầu 3' (tPse9) thu được từ ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza của đậu Hà Lan; một phần của trình tự cài vào từ vùng biên bên phải (right boundary-RB) của *Agrobacterium* và vùng bộ gen liền kề của cây đậu tương DBN9004 nằm ở đầu 3' của trình tự chuyển gen được cài vào (SEQ ID NO: 5). Trong phương pháp khuếch đại ADN, phân tử ADN đóng vai trò là đoạn môi có thể là phần bất kỳ thu được từ trình tự chuyển gen được cài vào ở cây đậu tương DBN9004 hoặc có thể là phần bất kỳ thu được từ vùng ADN của bộ gen đậu tương liền kề trong sự kiện đậu tương

chuyển gen DBN9004.

Sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có thể được kết hợp với các giống đậu tương chuyển gen khác như đậu tương có tính kháng thuốc diệt cỏ (ví dụ 2,4-D, dicamba, v.v.), hoặc các giống đậu tương chuyển gen mang các gen kháng côn trùng (ví dụ, *Cry1Ac*, *Cry2Ab*, v.v.). Các dạng kết hợp của tất cả các sự kiện chuyển gen khác nhau này, cùng với sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 theo sáng chế có thể được cùng nhân giống để tạo ra giống đậu tương chuyển gen lai tốt hơn vừa kháng được nhiều loài gây hại vừa kháng được nhiều loại thuốc diệt cỏ. Các giống này có thể thể hiện các đặc tính vượt trội như sản lượng tăng so với giống không chuyển gen và giống chuyển gen có một tính trạng.

Sáng chế đề xuất trình tự axit nucleic để phát hiện cây đậu tương có tính kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 và phương pháp phát hiện cây này. Sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có khả năng kháng các tác dụng gây độc đối với thực vật của các thuốc diệt cỏ dùng trong nông nghiệp chứa glufosinat và/hoặc glyphosat. Cây đậu tương hai tính trạng biểu hiện protein 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) kháng glyphosat của chủng *Agrobacterium* CP4, mà đem lại tính kháng glyphosat cho cây đậu tương, và biểu hiện protein phosphinomyxin N-acetyltransferaza (PAT) kháng glufosinat của *Streptomyces*, mà đem lại tính kháng glufosinat cho cây đậu tương. Cây đậu tương hai tính trạng này có các ưu điểm sau: 1) có khả năng kiểm soát cỏ trên phổ rộng khi phun các thuốc diệt cỏ dùng trong nông nghiệp chứa glyphosat lên các cây đậu tương; 2) sử dụng thuốc diệt cỏ glufosinat kết hợp với các tính trạng kháng glufosinat (kết hợp hoặc xen kẽ với các thuốc diệt cỏ glyphosat) có thể dùng làm biện pháp không chọn lọc để kiểm soát hiệu quả các loại cỏ kháng glyphosat; 3) trồng đồng thời các cây đậu tương chuyển gen

kháng thuốc diệt cỏ như là các cây đậu tương chuyển gen không kháng côn trùng với các cây đậu tương chuyển gen kháng côn trùng trong một quần thể có thể làm chậm việc gây ra tính kháng côn trùng/loài gây hại; và 4) không làm giảm sản lượng đậu tương. Ngoài ra, các gen mã hóa các tính trạng kháng glyphosat và kháng glufosinat được liên kết với nhau trên cùng một đoạn ADN và có mặt ở một locut của bộ gen đậu tương DBN9004, điều này giúp làm tăng hiệu quả nhân giống và cho phép sử dụng các chỉ thị phân tử để phát hiện các đoạn cài chuyển gen trong quần thể nhân giống và các cây con của chúng. Như vậy, SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó có thể được sử dụng làm các đoạn mồi hoặc các mẫu dò ADN trong phương pháp phát hiện theo sáng chế để tạo ra sản phẩm khuếch đại mà được xác định là sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 hoặc các cây con của chúng, và xác định được sự có mặt của các nguyên liệu thực vật thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 một cách nhanh, chính xác và ổn định.

Mô tả vắn tắt trình tự

SEQ ID NO: 1 Trình tự có chiều dài gồm 22 nucleotit ở đầu 5' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, trong đó nucleotit ở các vị trí 1-11 và nucleotit ở các vị trí 12-22 nằm ở cả hai phía của vị trí cài trên bộ gen của đậu tương, tương ứng;

SEQ ID NO: 2 Trình tự có chiều dài gồm 22 nucleotit ở đầu 3' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, trong đó nucleotit ở các vị trí 1-11 và nucleotit ở các vị trí 12-22 nằm ở cả hai phía của vị trí cài trên bộ gen của đậu tương, tương ứng;

SEQ ID NO: 3 Trình tự có chiều dài gồm 1207 nucleotit ở đầu 5' của trình

tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004;

SEQ ID NO: 4 Trình tự có chiều dài gồm 631 nucleotit ở đầu 3' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004;

SEQ ID NO: 5 Toàn bộ trình tự T-ADN, các trình tự bộ gen đầu tương liền kề ở đầu 5' và 3';

SEQ ID NO: 6 Trình tự mà nằm trong SEQ ID NO: 3 và nối trình tự nucleotit trong trình tự ADN của cấu trúc pDBN4003 và trình tự kết thúc phiên mã t35S;

SEQ ID NO: 7 Trình tự mà nằm trong SEQ ID NO: 4 và nối trình tự khởi động prGm17gTsfl và trình tự nucleotit trong trình tự ADN của cấu trúc pDBN4003;

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

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

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

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

SEQ ID NO: 12 Đoạn môi trên trình tự bộ gen liền kề ở đầu 5';

SEQ ID NO: 13 Đoạn môi nằm trên T-ADN và bắt cặp với SEQ ID NO: 12;

SEQ ID NO: 14 Đoạn môi trên trình tự bộ gen liền kề ở đầu 3', mà bắt cặp với SEQ ID NO: 12 để phát hiện xem liệu gen chuyển là đồng hợp tử hay dị hợp tử;

SEQ ID NO: 15 Đoạn môi nằm trên T-ADN và bắt cặp với SEQ ID NO: 14;

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

SEQ ID NO: 17 Đoạn mỗi Taqman 2 để phát hiện *EPSPS*;

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

SEQ ID NO: 19 Đoạn mỗi Taqman 3 để phát hiện *PAT*;

SEQ ID NO: 20 Đoạn mỗi Taqman 4 để phát hiện *PAT*;

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

SEQ ID NO: 22 Đoạn mỗi thứ nhất của gen nội sinh của ubiquitin ở đậu tương;

SEQ ID NO: 23 Đoạn mỗi thứ hai của gen nội sinh của ubiquitin ở đậu tương;

SEQ ID NO: 24 Mẫu dò của *EPSPS* trong phương pháp phát hiện bằng lai thẩm tách Nam;

SEQ ID NO: 25 Mẫu dò của *PAT* trong phương pháp phát hiện bằng lai thẩm tách Nam;

SEQ ID NO: 26 Đoạn mỗi nằm trên T-ADN cùng hướng với SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 27 Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ngược hướng với SEQ ID NO: 13 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kề;

SEQ ID NO: 28 Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ngược hướng với SEQ ID NO: 13 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kề;

SEQ ID NO: 29 Đoạn mỗi nằm trên T-ADN cùng hướng với SEQ ID NO: 15;

SEQ ID NO: 30 Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ngược hướng với SEQ ID NO: 15 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kề;

SEQ ID NO: 31 Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ngược hướng với SEQ ID NO: 15 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kề.

Giải pháp kỹ thuật theo sáng chế còn được mô tả chi tiết nhờ các hình vẽ

và các ví dụ dưới đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các giải pháp kỹ thuật về trình tự axit nucleic dùng để phát hiện cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ DBN9004 và phương pháp phát hiện chúng theo sáng chế sẽ được minh họa thêm dưới đây thông qua các phương án cụ thể.

Ví dụ 1. Tách dòng và biến nạp

1.1. Vector tách dòng

Vector biểu hiện tái tổ hợp pDBN4003 được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật tách dòng gen chuẩn (như được thể hiện trong Fig.2). Vector pDBN4003 chứa hai catxet biểu hiện chuyển gen nối tiếp, trong đó catxet biểu hiện thứ nhất chứa vùng khởi động của gen Tsfl của đậu tương (prGm17gTsfl) (mã hóa yếu tố kéo dài EF-1 α), mà có thể được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa (spAtCTP2) của peptit chuyển tiếp lục lạp EPSPS *Arabidopsis*, sau đó được liên kết hoạt động với 5-enol-pyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (cEPSPS) kháng glyphosat của chủng *Agrobacterium* CP4, và được liên kết hoạt động với trình tự không được dịch mã ở đầu 3' (tPse9) thu được từ ribuloza-1,5-bisphosphat carboxylaza của đậu Hà Lan; và catxet biểu hiện thứ hai chứa vùng khởi động của virus khảm súp lơ 35S (pr35S) chứa đoạn lặp vùng tăng cường nối tiếp, mà có thể được liên kết hoạt động với phosphinothrixin N-axetyltransferaza (cPAT) kháng glufosinat của *Streptomyces* và sau đó được liên kết hoạt động với vùng kết thúc của virus khảm súp lơ 35S (t35S).

Agrobacterium LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA; Cat. No: 18313-015) được biến nạp vector pDBN4003 bằng phương pháp nitơ lỏng, và tế bào được biến nạp được sàng lọc bằng cách sử dụng 5-enol-pyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) làm chỉ thị chọn lọc.

1.2. Biến nạp ở cây đậu tương

Việc biến nạp được thực hiện bằng phương pháp gây nhiễm qua *Agrobacterium* thông thường, và mô đốt lá mầm của đậu tương nuôi cấy vô trùng được đồng nuôi cấy với *Agrobacterium* được mô tả trong Ví dụ 1.1 để đưa T-ADN trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp pDBN4003 đã tạo ra vào nhiễm sắc thể của đậu tương để tạo ra sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004.

Nói tóm lại liên quan đến quá trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* ở đậu tương, hạt đậu tương trưởng thành được gieo trong môi trường nuôi cấy làm nảy mầm đậu tương (3,1g/L muối B5, vitamin B5, 20g/L sucroza, và 8g/L thạch, pH 5,6), và hạt được cấy trong môi trường nuôi cấy làm nảy mầm và được nuôi cấy trong điều kiện: nhiệt độ $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; và chu kỳ sáng (sáng/tối) là 16 giờ/8 giờ. Sau 4-6 ngày để nảy mầm, các cây giống con đậu tương vô trùng được nảy ra ở các đốt lá mầm xanh nhạt được lấy ra, các trục dưới lá mầm được cắt 3-4 millimet dưới các đốt lá mầm, các lá mầm được cắt theo chiều dọc, và chồi ở đỉnh, chồi bên và rễ hạt giống được loại bỏ. Tạo một tổn thương ở đốt lá mầm bằng cách sử dụng sống dao của dao mổ, các mô đốt lá mầm bị tổn thương được cho tiếp xúc với huyền phù *Agrobacterium*, trong đó *Agrobacterium* có thể chuyển trình tự nucleotit của gen *EPSPS* và trình tự nucleotit của gen *PAT* vào các mô đốt lá mầm bị tổn thương (bước 1: bước gây nhiễm). Ở bước này, tốt hơn nếu các mô đốt lá mầm được ngâm trong huyền phù *Agrobacterium* ($\text{OD}_{660} = 0,5-0,8$, môi trường nuôi cấy gây nhiễm (2,15g/L muối MS, Vitamin B5, 20g/L sucroza, 10g/L glucoza, 40mg/L axetosyringon (AS), 4g/L axit 2-morpholin etansulfonic (MES), và 2mg/L zeatin (ZT), pH 5,3)) để bắt đầu gây nhiễm. Các mô đốt lá mầm được đồng nuôi cấy với *Agrobacterium* trong một khoảng thời gian (3 ngày) (bước 2: bước đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, các mô đốt lá mầm được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy rắn (4,3g/L muối MS, Vitamin B5, 20g/L sucroza, 10g/L glucoza, 4g/L axit 2-morpholin etansulfonic

(MES), 2mg/L zeatin, và 8g/L thạch, pH 5,6) sau bước gây nhiễm. Sau giai đoạn đồng nuôi cấy này là bước “thu hồi” tùy ý. Ở bước “thu hồi”, có thể có ít nhất một kháng sinh (150-250mg/L cephalosporin) được biết đến là ức chế sự phát triển của *Agrobacterium* trong môi trường nuôi cấy thu hồi (3,1g/L muối B5, Vitamin B5, 1g/L axit 2-morpholin etansulfonic (MES), 30g/L sucroza, 2mg/L zeatin (ZT), 8g/L thạch, 150mg/L cephalosporin, 100mg/L axit glutamic, và 100mg/L axit aspartic, pH 5,6), mà không bổ sung chất chọn lọc tế bào biến nạp thực vật (bước 3: bước thu hồi). Tốt hơn là, các khối mô được tái sinh từ các đốt lá mầm được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy rắn có kháng sinh nhưng không có chất chọn lọc, để loại bỏ *Agrobacterium* và chuẩn bị giai đoạn thu hồi các tế bào được gây nhiễm. Tiếp đó, các khối mô được tái sinh từ các đốt lá mầm được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa chất chọn lọc (glyphosat), và mô sẹo đã biến nạp phát triển được chọn (bước 4: bước chọn lọc). Tốt hơn là, các khối mô được tái sinh từ các đốt lá mầm được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy rắn sàng lọc (3,1g/L muối B5, Vitamin B5, 1g/L axit 2-morpholin etansulfonic (MES), 30g/L sucroza, 1mg/L 6-benzyladenin (6-BAP), 8g/L thạch, 150mg/L cephalosporin, 100mg/L axit glutamic, 100mg/L axit aspartic, và 10mg/L muối glyphosat isopropylamin, pH 5,6) với chất chọn lọc, nhờ đó các tế bào đã biến nạp được phát triển liên tục. Sau đó, các cây được tái sinh từ các tế bào đã biến nạp (bước 5: bước tái sinh). Tốt hơn là, các khối mô được tái sinh từ các đốt lá mầm phát triển được trong môi trường nuôi cấy chứa chất chọn lọc được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy rắn (môi trường nuôi cấy biệt hóa B5 và môi trường nuôi cấy tạo rễ B5) để tái sinh cây.

Các mô kháng được chọn lọc ra được chuyển sang môi trường nuôi cấy biệt hóa B5 (3,1g/L muối B5, Vitamin B5, 1g/L axit 2-morpholin etansulfonic (MES), 30g/L sucroza, 1mg/L zeatin (ZT), 8g/L thạch, 150mg/L cephalosporin,

50mg/L axit glutamic, 50mg/L axit aspartic, 1mg/L gibberellin, 1mg/L auxin, và 10mg/L muối glyphosat isopropylamin, pH 5,6), và được nuôi cây ở 25°C để biệt hóa. Các cây giống con đã biệt hóa được chuyển vào môi trường nuôi cây tạo rễ B5 (3,1g/L muối B5, Vitamin B5, 1g/L axit 2-morpholin etansulfonic (MES), 30g/L sucroza, 8g/L thạch, 150mg/L cephalosporin, và 1mg/L axit indol-3-butyric (IBA)), được nuôi cây trong môi trường nuôi cây tạo rễ đến chiều cao bằng 10cm ở nhiệt độ 25°C, và được chuyển vào nhà kính để trồng cho đến khi ra quả. Trong nhà kính, các cây được trồng ở nhiệt độ 26°C trong 16 giờ, và sau đó được trồng ở nhiệt độ 20°C trong 8 giờ hàng ngày.

1.3. Xác định và sàng lọc các sự kiện chuyển gen

Tổng cộng 288 cây T₀ chuyển gen độc lập được tạo ra.

Sự có mặt hoặc không có mặt của các gen *EPSPS* và *PAT* trong các cây đậu tương chuyển gen tái sinh được kiểm tra bằng phân tích TaqManTM (xem ví dụ 2) và số bản sao trong các chủng kháng glyphosat và glufosinat được xác định. Bằng cách sàng lọc, sự kiện DBN9004 được chọn có đặc tính vượt trội với gen chuyển một bản sao, khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat, khả năng kháng thuốc diệt cỏ glufosinat và các tính trạng nông học tốt (xem ví dụ 6).

Ví dụ 2. Phát hiện sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 nhờ TaqMan.

Khoảng 100mg lá được lấy từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được dùng làm mẫu, và được chiết ADN bộ gen bằng cách sử dụng kit chiết ADN thực vật (DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen). Số bản sao của gen *EPSPS* và gen *PAT* được phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang sử dụng mẫu dò Taqman. Tại thời điểm này, các cây đậu tương kiểu dại được sử dụng làm đối chứng, và được phát hiện và được phân tích theo phương pháp nêu trên. Các thử nghiệm được lặp lại ba lần và được lấy trung bình.

Quy trình cụ thể là như sau:

Bước 11. 100mg lá được lấy ra từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, và được nghiền trong cối với nitơ lỏng thành dung dịch đồng nhất, và mỗi mẫu được lặp lại ba lần;

Bước 12. ADN bộ gen của các mẫu nêu trên được chiết bằng cách sử dụng DNeasy Plant Mini Kit của Qiagen, và phương pháp cụ thể có thể tham khảo hướng dẫn sử dụng sản phẩm;

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

Bước 14. Nồng độ của ADN bộ gen trong các mẫu nêu trên được điều chỉnh đến nồng độ thích hợp nằm trong khoảng từ 80 đến 100ng/μL;

Bước 15. Số bản sao trong các mẫu được xác định bằng cách sử dụng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang sử dụng mẫu dò Taqman, trong đó các mẫu mà được xác định số bản sao và đã biết được lấy làm mẫu chuẩn, các mẫu của các cây đậu tương kiểu đại được lấy làm đối chứng, và mỗi mẫu được tiến hành ba lần và lấy trung bình; các trình tự của các đoạn mồi và mẫu dò trong phản ứng PCR định lượng huỳnh quang là như sau, tương ứng:

các đoạn mồi và mẫu dò dưới đây được dùng để phát hiện trình tự gen *EPSPS*:

đoạn mồi 1: TTGGTGCTAACCTTACCGTTGAG, được thể hiện là SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự;

đoạn mồi 2: GCTTACCACGACCTTCAAGACG, được thể hiện là SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự;

mẫu dò 1: CTGATGCTGACGGTGTGCGTACCATC, được thể hiện là SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự;

các đoạn mồi và mẫu dò sau đây được dùng để phát hiện trình tự gen *PAT*:

đoạn mồi 3: CAGTTGAGATTAGGCCAGCTACAG, được thể hiện là

SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự;

đoạn mồi 4: TTCACTGTAGACGTCTCAATGTAATGG, được thể hiện là

SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự;

mẫu dò 2: CAGCTGATATGGCCGCGGTTTGTG, được thể hiện là SEQ

ID NO: 21 trong danh mục trình tự;

hệ phản ứng PCR:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) 10μL

50 × hỗn hợp đoạn mồi/mẫu dò 1μL

ADN bộ gen 3μL

nước (dd H₂O) 6μL

50 × hỗn hợp đoạn mồi/mẫu dò chứa 45μL mỗi đoạn mồi ở nồng độ bằng 1mM, 50μL mẫu dò ở nồng độ bằng 100μM, và 860μL dung dịch đệm L1× TE, và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong ống màu hổ phách.

Các điều kiện phản ứng PCR:

Bước	Nhiệt độ	thời gian
21	95°C	5 phút
22	95°C	30 giây
23	60°C	1 phút
24	trở lại bước 22, lặp lại 40 lần	

Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm SDS 2.3 (Applied Biosyterm), và sự kiện đầu tương chuyển gen một bản sao DBN9004 được tạo ra.

Ví dụ 3. Phát hiện sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004

3.1. Chiết ADN bộ gen

Chiết ADN được tiến hành theo phương pháp thường được sử dụng CTAB (xetyltrimetylamoni bromua): lấy 2g lá non từ sự kiện đầu tương chuyển gen

DBN9004, và nghiền thành bột trong nitơ lỏng, sau đó bổ sung 0,5mL dung dịch đệm CTAB chiết ADN (20g/L CTAB, 1,4M NaCl, 100mM Tris-HCl, 20mM EDTA (axit etylendiamintetraaxetic), và pH được điều chỉnh đến 8,0 bằng NaOH) được gia nhiệt trước ở nhiệt độ 65°C, và được trộn kỹ và sau đó chiết ở nhiệt độ 65°C trong 90 phút; bổ sung phenol với thể tích bằng 0,5 lần và cloroform với thể tích bằng 0,5 lần, sau đó đảo để trộn đều; ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút (vòng mỗi phút) trong 10 phút; hút bằng pipet dịch nổi, etanol khan với thể tích gấp hai lần, khuấy nhẹ ống ly tâm, và để yên ở nhiệt độ 4°C trong 30 phút; ly tâm lại ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút; thu thập ADN trong đáy ống; gạn bỏ dịch nổi và rửa kết tủa bằng 1mL etanol với nồng độ theo khối lượng bằng 70%; ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút; làm khô bằng cách hút trong chân không hoặc làm khô bằng cách thổi khí trên bàn thí nghiệm siêu sạch; và hòa tan kết tủa ADN trong một lượng dung dịch đệm TE thích hợp (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) và bảo quản ở điều kiện nhiệt độ bằng -20°C.

3.2. Phân tích trình tự ADN liên kế

Nồng độ của mẫu ADN được chiết trên đây được đo sao cho nồng độ của mẫu được thử nghiệm nằm trong khoảng từ 80 đến 100ng/μL. ADN bộ gen được phân cắt bằng các enzym giới hạn được chọn *PsiI*, *DraI* và *TaqI* (đối với phân tích đầu tận cùng 5') và *AflIII*, *TaqI* và *PsiI* (đối với phân tích đầu tận cùng 3'), tương ứng. 26,5μL ADN bộ gen, 0,5μL enzym giới hạn được chọn nêu trên và 3μL dung dịch đệm phân cắt enzym được bổ sung vào mỗi hệ phân cắt enzym, và được phân cắt trong 1 giờ. Sau khi hoàn tất phân cắt bằng enzym, 70μL etanol tuyệt đối được bổ sung vào hệ phân cắt enzym này, sau đó đặt vào bể đá trong 30 phút, ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 7 phút, dịch nổi được gạn bỏ, được làm khô bằng cách thổi khí, sau đó 8,5μl nước cất hai lần (dd H₂O), 1μL dung dịch đệm 10X T₄-ADN ligaza (dung

dịch đêm phản ứng NEB T4 ADN Ligaza, và công thức cụ thể của nó có thể xem trên trang web NEB hoặc <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases> và <https://www.neb.com/products/b0202-t4-ADN-ligase-reaction-buffer>) và 0,5µL T₄-ADN ligaza được bổ sung để thực hiện phản ứng nối ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Phản ứng khuếch đại PCR được tiến hành với một loạt các đoạn môi tiềm ẩn để phân lập các gen chuyển/ADN bộ gen ở đầu 5' và 3'. Đặc biệt là, hỗn hợp đoạn môi để phân lập gen chuyển/ADN bộ gen ở đầu 5' bao gồm SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 26 làm đoạn môi thứ nhất, SEQ ID NO: 27 và SEQ ID NO: 28 làm đoạn môi thứ hai, và SEQ ID NO: 13 làm đoạn môi giải trình tự. Cụ thể là, hỗn hợp đoạn môi để phân lập gen chuyển/ADN bộ gen ở đầu 3' bao gồm SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 29 làm đoạn môi thứ nhất, SEQ ID NO: 30 và SEQ ID NO: 31 làm đoạn môi thứ hai, và SEQ ID NO: 15 làm đoạn môi giải trình tự, và các điều kiện phản ứng PCR được thể hiện như trong bảng 3.

Các đơn vị siêu sao chép thu được được điện di trên 2,0% gel agarosa để tách sản phẩm phản ứng PCR, sau đó các đoạn đích được phân lập từ chất nền agarosa nhờ kit thu hồi gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Cat. No. 28704, Qiagen Inc., Valencia, CA). Sau đó, sản phẩm PCR đã tinh chế được giải trình tự (ví dụ, ABI Prism™ 377, PE Biosystem, Foster City, CA) và được phân tích (ví dụ, phần mềm phân tích trình tự ADNSTAR, ADNSTAR Inc., Madison, WI).

Các trình tự liên kề ở đầu 5' và 3' và các trình tự tiếp xúc được xác định bằng phương pháp PCR chuẩn. Trình tự liên kề ở đầu 5' và trình tự tiếp xúc có thể được xác định bằng cách sử dụng SEQ ID NO: 8 hoặc SEQ ID NO: 12, cùng với SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, hoặc SEQ ID NO: 26. Trình tự liên kề ở đầu 3' và trình tự tiếp xúc có thể được xác định bằng cách sử dụng SEQ ID NO: 11 hoặc SEQ ID NO: 14, cùng với SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 15, hoặc SEQ

ID NO: 29. Hệ phản ứng PCR và các điều kiện khuếch đại được thể hiện như trong bảng 2 và bảng 3. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các trình tự đoạn mồi khác cũng có thể được sử dụng để xác định các trình tự liên kề và các trình tự tiếp xúc.

Giải trình tự ADN của sản phẩm PCR thu được ADN mà có thể được sử dụng để thiết kế các phân tử ADN khác mà có thể được sử dụng làm các đoạn mồi và các mẫu dò để xác định các cây hoặc hạt đậu tương thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004.

Đã phát hiện ra rằng các vị trí 1-1268 của các nucleotit trong SEQ ID NO: 5 được thể hiện là trình tự liên kề biên bên phải (trình tự liên kề ở đầu 5') của trình tự được cài vào sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong trình tự bộ gen đậu tương, và các vị trí 6068-7059 của các nucleotit trong SEQ ID NO: 5 được thể hiện là trình tự liên kề biên bên trái (trình tự liên kề ở đầu 3') của trình tự được cài vào sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong trình tự bộ gen đậu tương. Trình tự tiếp hợp ở đầu 5' được nêu trong SEQ ID NO: 1, và trình tự tiếp hợp ở đầu 3' được nêu trong SEQ ID NO: 2.

3.3. Thử nghiệm tiếp hợp PCR

Trình tự tiếp hợp là một phân tử polynucleotit tương đối ngắn, mà là một trình tự ADN mới là dấu hiệu phát hiện ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 khi trình tự tiếp hợp này được phát hiện trong thử nghiệm axit polynucleic. Các trình tự tiếp hợp trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 là 11 polynucleotit ở mỗi phía của vị trí cài của các đoạn chuyển gen và ADN bộ gen đậu tương trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Trình tự tiếp hợp polynucleotit dài hơn hoặc ngắn hơn có thể được chọn từ SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4. Trình tự tiếp hợp (vùng liên kết ở đầu 5' SEQ ID NO: 1, và vùng liên kết ở đầu 3' SEQ ID NO: 2) là hữu dụng làm các phân tử mẫu dò

ADN hoặc các phân tử đoạn môi ADN trong các phương pháp phát hiện ADN. Các trình tự tiếp hợp SEQ ID NO: 6 và SEQ ID NO: 7 cũng là các trình tự ADN mới trong sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004, và cũng có thể được sử dụng làm các phân tử mồi dò ADN hoặc đoạn môi ADN để phát hiện sự có mặt của ADN sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004. SEQ ID NO: 6 (các vị trí 741-872 của các nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3) nối trình tự ADN của cấu trúc pDBN4003 và trình tự kết thúc t35S, và SEQ ID NO: 7 (các vị trí 170-287 của các nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4) nối trình tự khởi đầu prGm17gTsfl và trình tự ADN của cấu trúc pDBN4003.

Ngoài ra, đơn vị siêu sao chép được tạo ra bằng cách sử dụng ít nhất một đoạn mồi từ SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, và đoạn mồi này nếu được sử dụng trong phương pháp PCR được sử dụng để tạo ra đơn vị siêu sao chép dấu hiệu phát hiện của sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004.

Cụ thể là, sản phẩm PCR được tạo ra từ đầu 5' của trình tự chuyển gen được cài vào, và là một phần của ADN bộ gen mà liền kề với đầu 5' của trình tự được cài vào T-ADN trong bộ gen chứa các nguyên liệu thực vật thu được từ sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004. Sản phẩm PCR này bao gồm SEQ ID NO: 3. Để tiến hành khuếch đại PCR, đoạn mồi 5 (SEQ ID NO: 8) được lai với trình tự ADN bộ gen liền kề với đầu 5' của trình tự chuyển gen được cài vào, và đoạn mồi 6 (SEQ ID NO: 9) mà được bắt cặp với đoạn mồi 5 và nằm trên trình tự kết thúc phiên mã chuyển gen t35S được thiết kế.

Sản phẩm PCR được tạo ra từ đầu 3' của trình tự chuyển gen được cài vào, và chứa một phần của ADN bộ gen mà liền kề với đầu 3' của trình tự được cài vào T-ADN trong bộ gen chứa các nguyên liệu thực vật thu được từ sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004. Sản phẩm PCR này bao gồm SEQ ID NO: 4. Để tiến hành khuếch đại PCR, đoạn mồi 8 (SEQ ID NO: 11) được lai với trình tự

ADN bộ gen liền kề với đầu 3' của trình tự chuyển gen được cài vào, và đoạn mồi 7 (SEQ ID NO: 10), mà bắt cặp với đoạn mồi 8 và nằm ở đầu 3' của trình tự cài vào, của trình tự khởi động prGm17gTsf1.

Các điều kiện khuếch đại ADN được mô tả trong các bảng 2 và 3 có thể được sử dụng để tiến hành tiếp hợp PCR nêu trên để tạo ra đơn vị siêu sao chép dấu hiệu phát hiện của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Việc phát hiện các đơn vị siêu sao chép có thể được tiến hành bằng cách sử dụng thiết bị Stratagene Robocycler, MJ Engine, Perkin-Elmer 9700 hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient, v.v., hoặc bằng các phương pháp và thiết bị đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bảng 2. Các bước PCR và các điều kiện hỗn hợp phản ứng để xác định vùng tiếp hợp bộ gen/trình tự cài chuyển gen ở đầu 5' của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004

Bước	Các chất phản ứng	Lượng	Lưu ý
1	Nước không chứa nucleaza	được bổ sung đến thể tích cuối bằng 20 μ L	
2	dung dịch đệm phản ứng 10 $\times$ (với MgCl ₂)	2,0 μ L	Nồng độ cuối cùng của dung dịch đệm 1x, và MgCl ₂ có nồng độ cuối cùng bằng 1,5mM
3	Dung dịch 10mM chứa dATP, dCTP, dGTP và dTTP	0,4 μ L	mỗi dNTP có nồng độ cuối bằng 200 μ M
4	Đoạn mồi 5 của sự kiện	0,2 μ L	Nồng độ cuối

	(SEQ ID NO: 8 được tái huyền phù trong dung dịch đệm 1x TE hoặc nước không chứa nucleaza, đến nồng độ bằng 10 μ M)		bằng 0,1 μ M
5	Đoạn mồi 6 của sự kiện (SEQ ID NO: 9 được tái huyền phù trong dung dịch đệm 1x TE hoặc nước không chứa nucleaza, đến nồng độ bằng 10 μ M)	0,2 μ L	Nồng độ cuối bằng 0,1 μ M
6	RNaza, không chứa ADNza (500 μ g/ml)	0,1 μ L	50ng/phản ứng
7	<i>REDTaq</i> ® ADN Polymeraza (1 đơn vị/ μ l)	1,0 μ L (được gợi ý đổi pipet trước khi tiến hành bước tiếp theo)	1 đơn vị/phản ứng
8	ADN được chiết (khuôn mẫu): lá của mẫu được phân tích	200ng ADN bộ gen	
	Đối chứng âm	50ng ADN bộ gen của đậu tương không chuyển gen	
	Đối chứng âm	ADN không chứa khuôn mẫu (dung dịch trong đó ADN được tái huyền phù)	

	Đối chứng dương	50ng DBN9004 chứa ADN bộ gen của đậu tương	
--	-----------------	--	--

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

Số chu kỳ	Thông số cài đặt
1	94°C trong 3 phút
34	94°C trong 30 giây
	64°C trong 30 giây
	72°C trong 1 phút
1	72°C trong 10 phút

Các nguyên liệu được trộn nhẹ, nếu không có nắp cách điện trên thiết bị thiết bị luân nhiệt, 1-2 giọt dầu khoáng có thể được bổ sung trên mỗi dung dịch phản ứng. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các thông số chu kỳ trên đây (Bảng 3) trên thiết bị Stratagene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA), MJ Engine (MJ R-Biorad, Hercules, CA) Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA) hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). MJ Engine hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient cần được chạy theo phương thức tính toán. Tốc độ tăng nhiệt độ nên được để đến giá trị tối đa khi chạy thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer 9700.

Các kết quả thử nghiệm gợi ý rằng: nếu các đoạn mồi 5 và 6 (SEQ ID NO: 8 và 9) được sử dụng trong phản ứng PCR của ADN bộ gen của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, sản phẩm khuếch đại của đoạn 1207bp sẽ được tạo ra; nếu các đoạn mồi được sử dụng trong các phản ứng PCR của ADN bộ

gen của đậu tương không được biến nạp và ADN bộ gen của đậu tương không có DBN9004, không đoạn nào được khuếch đại; khi các đoạn mồi 7 và 8 (SEQ ID NO: 10 và 11) được sử dụng trong phản ứng PCR của ADN bộ gen của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, sản phẩm khuếch đại của đoạn 631bp sẽ được tạo ra; nếu các đoạn mồi được sử dụng trong phản ứng PCR của ADN bộ gen của đậu tương không được biến nạp và ADN bộ gen của đậu tương không có DBN9004, không đoạn nào được khuếch đại.

Thử nghiệm tiếp hợp PCR cũng có thể được sử dụng để xác định liệu nguyên liệu thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 là đồng hợp tử hay dị hợp tử. Đoạn mồi 9 (SEQ ID NO: 12), đoạn mồi 10 (SEQ ID NO: 13) và đoạn mồi 11 (SEQ ID NO: 14) được sử dụng cho phản ứng khuếch đại để tạo ra đơn vị siêu sao chép dấu hiệu phát hiện của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Các điều kiện khuếch đại ADN được mô tả trong các bảng 4 và 5 có thể được sử dụng cho thử nghiệm tiếp hợp nêu trên để tạo ra đơn vị siêu sao chép dấu hiệu phát hiện của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004.

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

Bước	Chất phản ứng	Lượng	Lưu ý
1	Nước không chứa nucleaza	Được bổ sung vào đến thể tích cuối bằng 10 μ L	
2	Hỗn hợp Universal Master 2x (Applied Biosystem Cat. No. 4304437)	5 μ L	Nồng độ cuối 1x
3	Đoạn mồi 9 SEQ ID NO: 12, đoạn mồi 10 SEQ ID NO: 13 và đoạn mồi 11 SEQ ID NO:	0,3 μ L	Nồng độ cuối bằng 0,1 μ M

	14 (được tái huyền phù trong nước không chứa nucleaza đến nồng độ cuối bằng 10 μ M)		
4	<i>REDTaq</i> ® ADN Polymeraza (1 đơn vị/ μ l)	1,0 μ L (được gợi ý đổi pipet trước khi tiến hành bước tiếp theo)	1 đơn vị/phản ứng
5	ADN được chiết (khuôn mẫu): Lá của mẫu được phân tích	200ng ADN bộ gen	
	Đối chứng âm	50ng ADN bộ gen của đậu tương không chuyển gen	
	Đối chứng âm	ADN không chứa khuôn mẫu (dung dịch trong đó ADN được tái huyền phù)	
	Đối chứng dương	50ng DBN9004 chứa ADN bộ gen đậu tương	

Bảng 5. Các điều kiện của thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer 9700 dùng trong thử nghiệm tiếp hợp

Số chu kỳ	Thông số thiết lập
1	95°C trong 10 phút
10	95°C trong 15 giây
	64°C trong 1 phút (-1°C/chu kỳ)
30	95°C trong 15 giây

	54°C trong 1 phút
1	Ngâm ở 10°C

PCR được tiến hành sử dụng các thông số chu kỳ trên đây (Bảng 5) trên thiết bị Stratagene Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA), MJ Engine (MJ R-Biorad, Hercules, CA) Perkin-Elmer 9700 (Perkin Elmer, Boston, MA) hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). MJ Engine hoặc thiết bị luân nhiệt Eppendorf Mastercycler Gradient cần được chạy theo phương thức tính toán. Tốc độ tăng nhiệt độ nên được đặt ở giá trị tối đa khi chạy trên thiết bị luân nhiệt Perkin-Elmer 9700.

Trong phản ứng khuếch đại, mẫu sinh học chứa ADN khuôn mẫu chứa ADN để phát hiện sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu; hoặc phản ứng này sẽ tạo ra hai đơn vị siêu sao chép ADN khác nhau từ mẫu sinh học chứa ADN thu được từ bộ gen đậu tương, ADN thu được từ bộ gen đậu tương là dị hợp tử với alen tương ứng với ADN được cài vào có mặt trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Hai đơn vị siêu sao chép khác nhau này sẽ tương ứng với đơn vị siêu sao chép thứ nhất thu được từ locut bộ gen đậu tương kiểu dại và đơn vị siêu sao chép thứ hai mà xác định sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Duy chỉ có mẫu ADN đậu tương tương ứng với đơn vị siêu sao chép đơn của đơn vị siêu sao chép thứ hai được mô tả cho bộ gen dị hợp tử được tạo ra, do đó sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu có thể được phát hiện và được xác định, và mẫu được tạo ra bởi hạt đậu tương mà đồng hợp tử với alen tương ứng với ADN được cài vào có mặt trong cây đậu tương chuyển gen DBN9004.

Cần lưu ý rằng cặp mỗi của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được sử dụng để tạo ra các đơn vị siêu sao chép mà là dấu hiệu phát hiện ADN bộ gen của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Cặp đoạn mỗi này bao gồm

nhưng không chỉ giới hạn ở, các đoạn mồi 5 và 6 (SEQ ID NO: 8 và 9), và các đoạn mồi 7 và 8 (SEQ ID NO: 10 và 11) để sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN được mô tả trên đây. Ngoài ra, một cặp mồi đối chứng gồm các đoạn mồi 12 và 13 (SEQ ID NO: 22 và 23) được sử dụng để khuếch đại gen nội sinh của đậu tương được bao gồm làm chất chuẩn nội cho các điều kiện phản ứng. Phân tích mẫu chiết ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 phải bao gồm mẫu chiết ADN mô đối chứng dương của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, mẫu chiết ADN đối chứng âm thu được từ sự kiện đậu tương không chuyển gen DBN9004 và đối chứng âm không có trong dịch chiết ADN đậu tương khuôn mẫu. Ngoài các cặp đoạn mồi này, cặp mồi bất kỳ trong số các cặp mồi từ SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, hoặc các trình tự bổ sung của nó, cũng có thể được sử dụng, và nếu chúng được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại ADN, các đơn vị siêu sao chép chứa SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 mà là dấu hiệu nhận biết đối với các mô thu được từ cây đậu tương mang sự kiện chuyển gen DBN9004 sẽ được tạo ra, tương ứng. Các điều kiện khuếch đại ADN được mô tả trong các bảng 2-5 có thể được sử dụng để tạo ra các đơn vị siêu sao chép dấu hiệu nhận biết của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 với cặp mồi thích hợp. Nếu được thử nghiệm trong phương pháp khuếch đại ADN, dịch chiết chứa ADN của cây hoặc hạt đậu tương mà tạo ra đơn vị siêu sao chép dấu hiệu phát hiện sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và do đó được coi là chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, hoặc sản phẩm thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, có thể được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng khuếch đại để xác định sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004.

Ví dụ 4. Phát hiện sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 bằng cách lai thẩm tách Nam

4.1. Chiết ADN để lai thẩm tách Nam

Phân tích thẩm tách Nam được tiến hành nhờ các sự kiện biến nạp đồng hợp tử thể hệ T4, T5 và T6. Mô cây đậu tương được nghiền trong nitơ lỏng sử dụng cối và chày. 4-5g mô cây đậu tương đã nghiền được tái huyền phù trong 20mL dung dịch đệm phân giải CTAB (100mM Tris pH 8,0, 20mM EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 0,2% thể tích/thể tích β -mercaptoetanol, 2% khối lượng/thể tích polyvinyl-pyrrolidon), và ủ ở nhiệt độ 65°C trong 60 phút. Trong thời gian ủ, mẫu được đảo để trộn đều 10 phút một lần. Sau khi ủ, bổ sung một thể tích tương đương của cloroform/rượu isoamyl (24:1), và trộn nhẹ bằng cách đảo, sau đó ly tâm ở tốc độ bằng 4000 vòng/phút trong 20 phút. Pha nước được thu gom, và để yên ở nhiệt độ -20°C trong 1 giờ sau khi bổ sung một thể tích tương đương isopropanol, để kết tủa ADN, sau đó ly tâm ở tốc độ bằng 4000 vòng/phút trong 5 phút để thu được kết tủa ADN mà được tái huyền phù sau đó trong 1mL dung dịch đệm TE. Để làm thoái biến ARN có mặt, ADN được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút với 5 μ L ARNaza có nồng độ bằng 30mg/mL, sau đó ly tâm ở tốc độ bằng 4000 vòng/phút trong 5 phút, và sau đó ly tâm ở tốc độ bằng 14.000 vòng/phút trong 10 phút để kết tủa ADN với sự có mặt của 0,1 thể tích 3M natri axetat và 2 thể tích etanol khan. Sau khi dịch nổi được gạn bỏ, rửa kết tủa bằng 1mL 70% (thể tích/thể tích) etanol, làm khô, và sau đó hòa tan lại trong 1mL dung dịch đệm TE. Nồng độ của ADN bộ gen trong các mẫu nêu trên được phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đo phổ khối siêu vi (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

4.2. Phân cắt bằng enzym giới hạn

Trong 100 μ L hệ phản ứng, 5 μ g ADN được phân cắt mỗi thời điểm. ADN bộ gen được phân cắt bằng các enzym giới hạn *EcoRI* và *EcoRV*, tương ứng, với các trình tự riêng của *EPSPS* và *PAT* trên T-ADN làm các mẫu dò. Đối với

mỗi enzym, các sản phẩm phân cắt được ủ qua đêm ở nhiệt độ thích hợp. Mẫu này được quay bằng thiết bị cô chân không ly tâm (thiết bị cô chân không tốc độ, Thermo Scientific) để làm giảm thể tích đến 20 μ L.

4.3. Điện di trên gel

Thuốc nhuộm tải màu xanh Bromophenol được bổ sung vào mỗi mẫu thu được từ ví dụ 4.2, và mỗi mẫu được tải lên trên gel agarosa 0,7% chứa ethidi bromua, sau đó được phân tách bằng cách điện di trong dung dịch đệm điện di TAE (40mM Tris-axit axetic, 2mM EDTA, pH 8,0), và chạy điện di trên gel qua đêm ở điện áp 20 vol.

Xử lý gel bằng dung dịch biến tính (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) và dung dịch trung hòa (1,5M NaCl, 0,5M Tris, pH 7,2) trong 30 phút, tương ứng. 5 $\times$ SSC được rót vào đĩa sứ, một mảnh thủy tinh được đặt lên, và sau đó đặt liên tiếp cầu giấy lọc, gel, màng nylon có điện tích dương (Roche, Cat. No. 11417240001), giấy lọc ba lớp, khăn giấy, và một vật nặng. Sau khi xuyên thấm tách qua qua đêm ở nhiệt độ phòng, màng nylon được rửa trong 2 $\times$ SSC trong 10 giây, và ADN được cố định trên màng bằng cách liên kết ngang nhờ tia UV.

4.4. Lai

Trình tự ADN thích hợp được khuếch đại bằng PCR để chuẩn bị mẫu dò. Các mẫu dò ADN là SEQ ID NO:24 và SEQ ID NO:25, hoặc tương đồng hoặc bổ sung với các trình tự nêu trên. Đánh dấu DIG các mẫu dò, lai thẩm tách Nam, phát hiện tín hiệu, và các thao tác khác được tiến hành bằng cách đánh dấu bằng digoxin có hiệu quả cao đối với ADN và kit phát hiện II (DIG High Prime ADN labelling và Detection Starter Kit II kit, Roche, Cat. No. 1585614910), và các phương pháp cụ thể có thể tham khảo các thông số sản phẩm của chúng.

Mỗi thử nghiệm thẩm tách Nam gồm hai mẫu đối chứng: (1) ADN từ thể

phân ly âm tính (không được biến nạp), mà được sử dụng để xác định trình tự đậu tương nội sinh bất kỳ mà có thể lai với mẫu dò đặc hiệu yếu tố; (2) plasmid pDBN4003 được phân cắt bằng *Hind* III tương đương với một số bản sao dựa trên chiều dài mẫu dò, mà được sử dụng làm đối chứng dương để lai và được sử dụng để thể hiện độ nhạy của thử nghiệm.

Số liệu lai đã đưa ra bằng chứng để chứng minh phân tích TaqMan™ PCR, tức là, cây đậu tương DBN9004 chứa các bản sao đơn của các gen *EPSPS* và *PAT*. Các vạch đơn có kích thước 11kb và 13kb được tạo ra bằng cách phân cắt *EcoR* I và *EcoR* V sử dụng mẫu dò EPSPS, tương ứng; các vạch đơn có kích thước 8kb và 3,2kb được tạo ra bằng cách phân cắt *EcoR* I và *EcoR* V sử dụng mẫu dò PAT, tương ứng. Điều này chỉ ra rằng mỗi bản sao của *EPSPS* và *PAT* đều có mặt trong sự kiện đậu tương được biến nạp DBN9004.

Ví dụ 5. Phát hiện protein được gọi là sự kiện đậu tương chuyển gen bằng ELISA

Mức biểu hiện của các protein EPSPS và PAT trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có thể được phát hiện bằng ELISA.

2mg lá mới chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được lấy làm mẫu, và được nghiền trong nitơ lỏng, sau đó bổ sung 1mL dung dịch đệm chiết (8g/L NaCl, 0,27g/L KH₂PO₄, 1,42g/L Na₂HPO₄, 0,2g/L KCl, và 5,5ml/L Tween-20, pH 7,4), sau đó ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, pha loãng dịch nổi 40 lần bằng dung dịch đệm chiết và lấy 80μL dịch nổi đã pha loãng để phát hiện bằng ELISA.

Tỷ lệ lượng của các protein (protein EPSPS và protein PAT) theo khối lượng trong mẫu lá mới được đo và được phân tích bằng kit ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym) (ENVIRLOGIX Company, kit EPSPS và kit PAT). Các phương pháp cụ thể có thể tham khảo đến các thông số kỹ thuật

của sản phẩm. Cùng lúc đó, lá của các cây đậu tương kiểu dại (không chuyển gen, NGM) được sử dụng làm đối chứng, và được phát hiện và được phân tích theo phương pháp nêu trên, và mỗi cây được tiến hành lặp lại 6 lần.

Các kết quả thử nghiệm về lượng protein (protein EPSPS và protein PAT) của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được thể hiện trong Bảng 6. Tỷ lệ mức biểu hiện trung bình của các protein EPSPS trong lá mới chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và lá mới của các cây đậu tương kiểu dại theo khối lượng ($\mu\text{g/g}$) được xác định là 230,9 và 0, tương ứng; và tỷ lệ mức biểu hiện trung bình của protein PAT trong lá mới chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và lá mới của cây đậu tương kiểu dại ($\mu\text{g/g}$) là 200,1 và 0, tương ứng.

Bảng 6. Các kết quả đo trung bình của mức biểu hiện ($\mu\text{g/g}$) của các protein của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004

Protein/cây	DBN9004	NGM
Protein EPSPS	230,9 $\pm$ 10,4	0
Protein PAT	200,1 $\pm$ 10,7	0

Ví dụ 6. Phát hiện tính kháng thuốc diệt cỏ của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004

Trong thử nghiệm này, thuốc diệt cỏ Roundup (chế phẩm chứa nước chứa 41% muối glyphosat isopropylamoni) và thuốc diệt cỏ Basta (với hoạt chất là 18% glufosinat) được sử dụng để phun. Thiết kế khối ngẫu nhiên được sử dụng, với 3 lần lặp lại. Mảnh đất có diện tích 18m² (5m $\times$ 3,6m), với khoảng cách hàng là 60cm, khoảng cách cây là 8cm, phương pháp chăm sóc và trồng trọt theo cách thông thường được sử dụng, và có một khu vực cách ly rộng bằng 1m giữa các mảnh đất. 3 kiểu xử lý sau được tiến hành trên sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004: 1) không phun thuốc diệt cỏ, và cỏ được kiểm soát bởi người trồng; 2) thuốc diệt cỏ Roundup được phun ở liều 1680g a.e./ha. (a.e./ha

được dùng để chỉ “đương lượng axit hoạt chất mỗi hecta”) ở giai đoạn lá V3, sau đó thuốc diệt cỏ Roundup được phun lại ở giai đoạn R2 (giai đoạn nở rộ) ở cùng liều; 3) thuốc diệt cỏ Basta được phun ở liều 800g a.i./ha. (a.i./ha được dùng để chỉ “hoạt chất mỗi hecta”) ở giai đoạn lá V3, sau đó thuốc diệt cỏ Basta được phun lại ở giai đoạn V6 với cùng liều; 4) thuốc diệt cỏ Basta được phun với liều 800g a.i./ha ở giai đoạn lá V3, sau đó thuốc diệt cỏ Roundup được phun với liều 1680g a.e./ha ở giai đoạn R2. Thử nghiệm đối chứng song song được tiến hành với các cây đậu tương kiểu dại (không chuyển gen, NGM). Cần lưu ý rằng việc chuyển hóa thuốc diệt cỏ glyphosat có hàm lượng và dạng liều khác nhau thành dạng tương đương axit glyphosat, và sự chuyển hóa của dung dịch glufosinat có nồng độ khác nhau thành dạng hoạt chất tương đương glufosinat được mô tả trên đây được áp dụng theo các kết luận dưới đây.

Các dấu hiệu của tính độc thực vật được nghiên cứu ở thời điểm 1 tuần và 2 tuần sau khi sử dụng, và sản lượng đậu tương thu được ở mảnh đất trồng được đánh giá sau khi thu hoạch. Việc phân loại các dấu hiệu gây độc thực vật được thể hiện như trong bảng 7. Tỷ lệ thiệt hại do thuốc diệt cỏ được sử dụng như một chỉ số để đánh giá tính kháng thuốc diệt cỏ của sự kiện được biến nạp. Đặc biệt là, tỷ lệ thiệt hại do thuốc diệt cỏ (%) = Σ (số cây bị thiệt hại có cùng mức $\times$ số mức)/(tổng số cây $\times$ mức cao nhất); trong đó tỷ lệ thiệt hại do thuốc diệt cỏ bao gồm tỷ lệ thiệt hại do glyphosat và tỷ lệ thiệt hại do glufosinat, và tỷ lệ thiệt hại do thuốc diệt cỏ được xác định dựa vào các kết quả nghiên cứu tính độc thực vật 2 tuần sau khi xử lý bằng glyphosat hoặc glufosinat. Sản lượng của đậu tương trong mỗi mảnh đất là tổng sản lượng (khối lượng) hạt đậu tương được cân ở ba hàng giữa của mỗi mảnh đất. Mức chênh lệch về sản lượng giữa các lần xử lý khác nhau được đánh giá dưới dạng phần trăm sản lượng, trong đó phần trăm sản lượng (%) = sản lượng thu được khi có phun thuốc diệt cỏ/sản

lượng thu được khi không phun thuốc diệt cỏ. Các kết quả về tính kháng thuốc diệt cỏ của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và sản lượng đậu tương như được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 7. Các tiêu chuẩn phân loại mức độ thực vật do thuốc diệt cỏ gây ra cho các cây đậu tương

Mức độ thực vật	Mô tả dấu hiệu
1	Phát triển bình thường, không có dấu hiệu về sự thiệt hại bất kỳ
2	Gây độc thực vật nhẹ, mức gây độc thực vật là dưới 10%
3	Gây độc thực vật vừa phải, có thể phục hồi sau đó, không làm ảnh hưởng đến sản lượng
4	Gây độc thực vật tương đối nặng, khó phục hồi, dẫn đến sản lượng giảm
5	Gây độc thực vật nặng, không thể phục hồi, dẫn đến làm giảm sản lượng đáng kể hoặc mất hoàn toàn sản lượng

Bảng 8. Các kết quả về tính kháng thuốc diệt cỏ của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 và các kết quả về thử nghiệm sản lượng

Mục đánh giá/cây	DBN9004	NGM
Tỷ lệ thiệt hại do thuốc diệt cỏ (%) (không phun thuốc)	0	0
Tỷ lệ thiệt hại do glyphosat (%)	0	100
Tỷ lệ thiệt hại do glufosinat (%)	0	100
Tỷ lệ thiệt hại do glufosinat + glyphosat (%)	0	100

Tỷ lệ sản lượng (%) (glyphosat)	109,7	0
Tỷ lệ sản lượng (%) (glufosinat)	106,2	0
Tỷ lệ sản lượng (%) (glufosinat + glyphosat)	111,5	0

Các kết quả thu được đã chỉ ra rằng đối với tỷ lệ thiệt hại do thuốc diệt cỏ (glyphosat và glufosinat): 1) tỷ lệ thiệt hại của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 gần như bằng 0 trong điều kiện xử lý bằng thuốc diệt cỏ glyphosat (1680g a.e./ha); 2) tỷ lệ thiệt hại của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 cũng gần như bằng 0 trong điều kiện xử lý bằng thuốc diệt cỏ glufosinat (800 g a.i./ha); 3) tỷ lệ thiệt hại của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 cũng gần như bằng 0 trong điều kiện xử lý bằng thuốc diệt cỏ glufosinat (800 g a.i./ha) và thuốc diệt cỏ glyphosat (1680 g a.e./ha); do đó, sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có tính kháng thuốc diệt cỏ (glyphosat và glufosinat) tốt.

Đối với sản lượng: sản lượng của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được tăng nhẹ ở cả ba trường hợp xử lý phun thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ glyphosat (1680g a.e./ha), thuốc diệt cỏ glufosinat (800g a.i./ha), và thuốc diệt cỏ glufosinat (800g a.i./ha) + thuốc diệt cỏ glyphosat (1680g a.e./ha) so với sản lượng ở trường hợp xử lý không phun thuốc diệt cỏ, nhờ đó còn chỉ ra rằng sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có tính kháng thuốc diệt cỏ (glyphosat và glufosinat) tốt.

Ví dụ 7.

Ví dụ, các sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp có thể được sản xuất từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004. Nếu mức biểu hiện đủ được phát hiện trong các sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp, các sản phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp được cho là chứa trình tự nucleotit có khả năng phát hiện sự có mặt của nguyên liệu sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong các sản

phẩm hoặc hàng hóa nông nghiệp. Thực phẩm hoặc hàng hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sản phẩm thu được từ cây đậu tương DBN9004, như bánh đậu tương, bột đậu tương và dầu đậu tương, đặc biệt là lexitin, axit béo, glyxerol, sterol, dầu ăn được, vảy đậu tương đã loại chất béo, bột đậu tương đã sấy và loại chất béo, cục sữa đậu tương, bánh đậu, dịch cô protein đậu tương, protein đậu tương phân lập, protein thực vật đã thủy phân, protein đậu tương đã chuẩn hóa, chất xơ protein đậu tương, v.v.. Phương pháp phát hiện axit nucleic và/hoặc kit dựa trên mẫu dò hoặc cặp đoạn mồi có thể được triển khai để phát hiện trình tự nucleotit của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 như được thể hiện trong ví dụ, SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 trong mẫu sinh học, trong đó trình tự mẫu dò hoặc trình tự đoạn mồi được chọn từ các trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 hoặc một đoạn của chúng hoặc trình tự bổ sung của chúng, để phát hiện sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004.

Cuối cùng, sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 theo sáng chế có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và thuốc diệt cỏ glufosinat tốt hơn và không làm ảnh hưởng đến sản lượng và phương pháp phát hiện có thể xác định một cách nhanh và chính xác liệu phân tử ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 có được chứa trong mẫu sinh học hay không.

Hạt tương ứng với sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được bảo quản trong trung tâm lưu trữ chủng nuôi cấy vi sinh vật của Trung Quốc (được viết tắt là CGMCC, có địa chỉ: Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, No. 3, No. 1 Courtyard, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing, Postcode: 100101) vào ngày 27/11/2015, mà phân lớp và danh pháp là đậu tương (*Glyxyn max*), và số truy nhập là CGMCC No. 11171. Các chủng lưu trữ sẽ được lưu giữ trong 30 năm.

Cuối cùng, cần hiểu rằng các phương án trên đây chỉ được sử dụng nhằm minh họa chứ không làm giới hạn giải pháp kỹ thuật của sáng chế; và mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết có dựa vào các phương án được ưu tiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng các cải biến hoặc các thay thế tương đương có thể được tiến hành đối với giải pháp kỹ thuật của sáng chế mà không nằm ngoài phạm vi và tinh thần của giải pháp kỹ thuật của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử axit nucleic, khác biệt ở chỗ, trình tự axit nucleic này bao gồm trình tự axit nucleic nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó phân tử axit nucleic này thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc.

2. Phân tử axit nucleic theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, trình tự axit nucleic này bao gồm SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự bổ sung của nó.

3. Phân tử axit nucleic theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, trình tự axit nucleic này bao gồm SEQ ID NO: 5 hoặc trình tự bổ sung của nó.

4. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với ít nhất hai đoạn mồi để khuếch đại sản phẩm khuếch đại đích trong phản ứng khuếch đại axit nucleic;

thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic; và

phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại đích;

trong đó sản phẩm khuếch đại đích bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, trong đó sản phẩm khuếch đại đích này thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc.

5. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu theo điểm 4, khác biệt ở chỗ, sản phẩm khuếch đại đích còn bao SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và/hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc

trình tự bổ sung của nó.

6. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu theo điểm 4 hoặc 5, khác biệt ở chỗ, các đoạn môi bao gồm SEQ ID NO: 8 và SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11.

7. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với mẫu dò, trong đó mẫu dò này bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, và mẫu dò này thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc;

lai mẫu cần được phát hiện với mẫu dò trong các điều kiện lai nghiêm ngặt; và phát hiện tình trạng lai giữa mẫu cần được phát hiện và mẫu dò.

8. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu theo điểm 7, khác biệt ở chỗ, mẫu dò này còn bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

9. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu theo điểm 7 hoặc 8, khác biệt ở chỗ, ít nhất một mẫu dò được đánh dấu bằng ít nhất một chất huỳnh quang.

10. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

cho mẫu cần được phát hiện tiếp xúc với phân tử axit nucleic chỉ thị, trong đó phân tử axit nucleic chỉ thị này bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, và phân tử axit nucleic chỉ thị

này thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc;

lai mẫu cần được phát hiện với phân tử axit nucleic chỉ thị trong các điều kiện lai nghiêm ngặt; và

phát hiện tình trạng lai giữa mẫu cần được phát hiện với phân tử axit nucleic chỉ thị, và còn tiến hành phân tích nhân giống có sự trợ giúp của chỉ thị để xác định mối liên hệ gen giữa khả năng kháng glyphosat và/hoặc khả năng kháng glufosinat và phân tử axit nucleic chỉ thị về mặt di truyền.

11. Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN của sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 trong mẫu theo điểm 10, khác biệt ở chỗ, phân tử axit nucleic chỉ thị này còn bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

12. Kit phát hiện ADN, khác biệt ở chỗ, kit này chứa ít nhất một phân tử ADN, trong đó phân tử ADN này bao gồm SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự bổ sung của nó, hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc trình tự bổ sung của nó, và phân tử ADN này có thể hoạt động như một đoạn mồi hoặc mẫu dò ADN đặc hiệu cho sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 hoặc thể hệ con của nó, trong đó phân tử ADN này thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc.

13. Kit phát hiện ADN theo điểm 12, khác biệt ở chỗ, khi hoạt động như một mẫu dò, phân tử ADN còn bao gồm ít nhất một trình tự được chọn từ SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung của nó, và SEQ ID NO: 7 hoặc trình tự bổ sung của nó.

14. Phương pháp tạo ra cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các

bước:

lai cây đậu tương chứa, trong bộ gen của nó, SED ID NO: 1, các nucleotit 1343-6000 của SEQ ID NO:5 và SED ID NO: 2 trong trình tự, với cây đậu tương khác, nhờ đó tạo ra các cây con;

chọn các cây con chứa SEQ ID NO: 1, các nucleotit 1343-6000 của SEQ ID NO:5 và SED ID NO: 2 trong trình tự bộ gen của nó, hoặc chứa SEQ ID NO: 5 trong bộ gen của nó, trong đó các cây con này có tính kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat.

15. Phương pháp tạo ra cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat theo điểm 14, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

lai hữu tính cây đậu tương bố mẹ thứ nhất chứa sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 mà kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat với cây đậu tương bố mẹ thứ hai mà không có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat để tạo ra một số lượng lớn các cây con;

xử lý cây con bằng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat; và

chọn cây con mà có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat;

trong đó, sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc.

16. Phương pháp canh tác cây đậu tương kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm các bước:

gieo ít nhất một hạt đậu tương, trong đó hạt đậu tương này chứa, trong bộ gen của nó, trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu, và trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu này bao gồm SEQ ID NO: 1, các nucleotit 1343-6000 của SEQ ID NO:5

và SED ID NO: 2 trong trình tự, hoặc trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu bao gồm SEQ ID NO: 5;

để hạt đậu tương phát triển thành cây đậu tương; và

phun một liều hữu hiệu thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc thuốc diệt cỏ glufosinat lên cây đậu tương và thu hoạch cây với mức thiệt hại cây trồng giảm so với các cây khác không mang trình tự axit nucleic của vùng đặc hiệu.

17. Phương pháp bảo vệ cây trồng không bị thiệt hại do thuốc diệt cỏ gây ra, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước phun thuốc diệt cỏ chứa một lượng hữu hiệu glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen, trong đó cây đậu tương chuyển gen chứa, trong bộ gen của nó, SEQ ID NO: 1, các nucleotit 1343-6000 của SEQ ID NO:5 và SED ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây đậu tương chuyển gen chứa SEQ ID NO: 5 trong bộ gen của nó, và cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc glufosinat.

18. Phương pháp kiểm soát cỏ trên cánh đồng, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước phun thuốc diệt cỏ chứa một lượng hữu hiệu glyphosat và/hoặc glufosinat lên cánh đồng trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen, trong đó cây đậu tương chuyển gen chứa, trong bộ gen của nó, SEQ ID NO: 1, các nucleotit 1343-6000 của SEQ ID NO:5 và SED ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây đậu tương chuyển gen chứa SEQ ID NO: 5 trong bộ gen của nó, và cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat và/hoặc glufosinat.

19. Phương pháp kiểm soát cỏ kháng glyphosat trên cánh đồng trồng cây kháng glyphosat, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước phun thuốc diệt cỏ chứa một lượng hữu hiệu glufosinat lên cánh đồng trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat, trong đó cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat bao gồm, trong bộ gen của nó, SEQ ID NO: 1, các nucleotit

1343-6000 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat chứa SEQ ID NO: 5 trong bộ gen của nó, và cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glufosinat cùng một lúc.

20. Phương pháp làm chậm sự kháng thuốc của côn trùng, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước trồng ít nhất một cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng glyphosat và/hoặc glufosinat trên cánh đồng trồng cây đậu tương kháng côn trùng, trong đó cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat và/hoặc glufosinat chứa, trong bộ gen của nó, SEQ ID NO: 1, các nucleotit 1343-6000 của SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 2 trong trình tự, hoặc cây đậu tương chuyển gen kháng glyphosat và/hoặc glufosinat chứa SEQ ID NO: 5 trong bộ gen của nó.

21. Hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, khác biệt ở chỗ, hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp này là vảy đậu tương, bột đậu tương, protein đậu tương hoặc sản phẩm cô của nó, dầu đậu tương, chất xơ protein đậu tương, cục sữa đậu tương; trong đó sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc.

22. Hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 theo điểm 21, khác biệt ở chỗ, cục sữa đậu tương là đậu phụ.

23. Hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp thu được từ sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004, khác biệt ở chỗ, hàng hóa hoặc sản phẩm nông nghiệp này là lecithin, axit béo, glyxerol, hoặc sterol, trong đó sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004 được lưu giữ dưới dạng hạt giống dưới số truy cập CGMCC No. 11171 tại Trung tâm lưu giữ vi sinh vật của Ủy ban quản lý chủng giống vi sinh vật Trung Quốc.

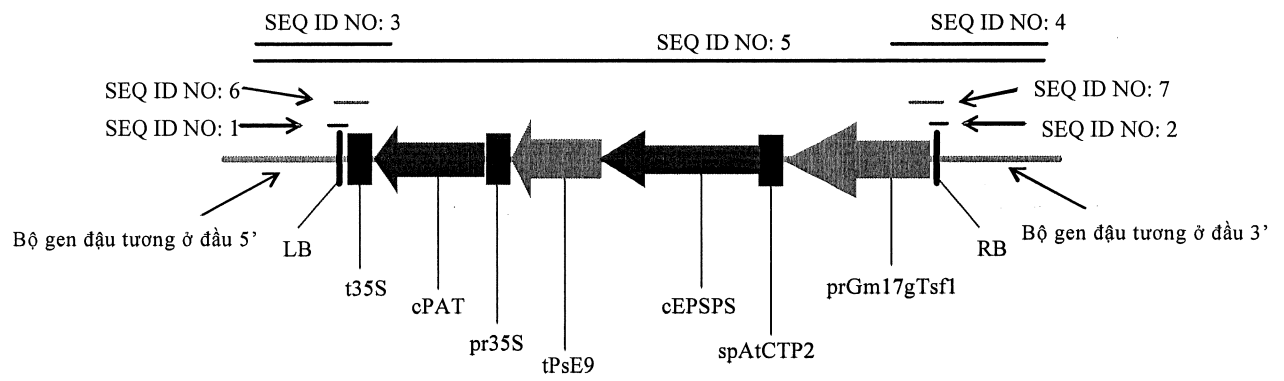


Fig.1

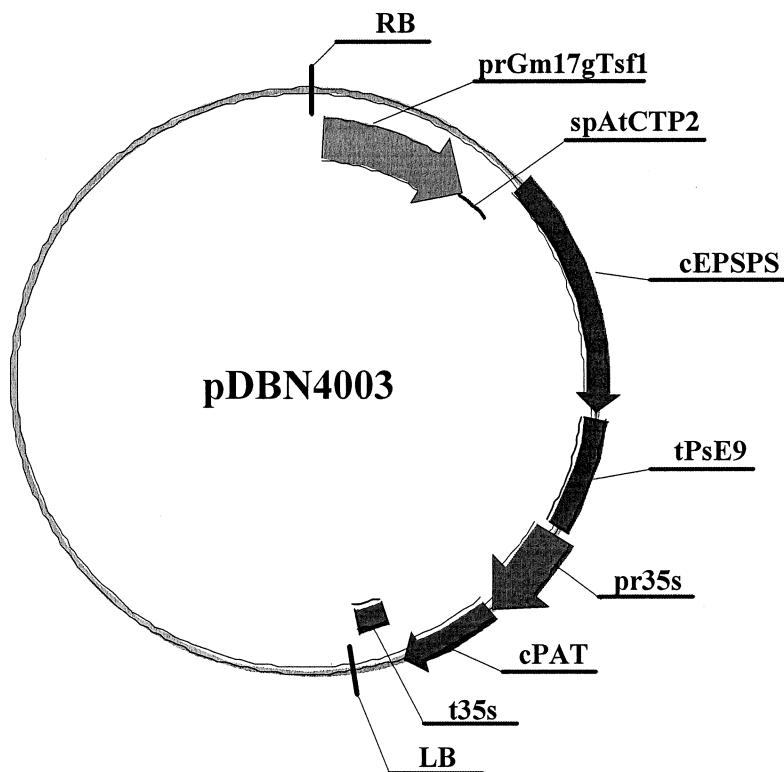


Fig.2

<110> BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD.
BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

<120> Phân tử axit nucleic dùng để phát hiện sự có mặt của sự kiện đậu tương chuyển gen, kit chứa phân tử axit nucleic này và phương pháp phát hiện sử dụng phân tử axit nucleic này

<130> FP1170131P

<160> 31

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự có chiều dài gồm 22 nucleotit nằm ở đầu 5' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004

<400> 1

tcacagagtt gtaaacaat tg

22

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự có chiều dài gồm 22 nucleotit nằm ở đầu 3' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004

<400> 2

tttgaagaca tatttttgtg ga

22

<210> 3

<211> 1207

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự có chiều dài gồm 1207 nucleotit nằm ở đầu 5' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đậu tương chuyển gen DBN9004

<400> 3

cgatagatta cgaataatag cgaaagatct gaaagaaatt ttcatgttc ttttatgaat 60

atgagtttga ctcttcttaa agttatataa aatttcgttg gttggacatt tccttttatg 120

gattaattac gtaattgtga cgacatgaaa ctgcagttta aactcactat aatttcttca 180

ataaatcatt actacacctg acatagtatt tactatTTTT aaaagtgttt aattttggat 240

tattattagt gtaacgaatt gaattaatta ttttcaaaaa catcactttt ttataaataa 300

aatcctaagg aataatttat tttatgggta gataaaattg attttaagta attgaatgaa 360

33582

atactcatag aaaacattga ataaaattgg aaactatgtc aaaattaatc tcaattatta	420
attcaaatgg gaatacatgc tttttattta ttaaaattac gagaattaaa tttctaaca	480
aaataaacag gatttgaatt tgtttatcaa acatacaatt acatttttga gtttgatctt	540
gtttatttta aagttgagta aaactatttt tgatataatt aattttaaac tcttggacct	600
gattaaaata tatatatata ttaaaatatg tattcgttat taaaaatata atacaaagaa	660
aatagacggg acttgatgaa agaagagcgt tgcatttacg ctccataaac gtgtgctttc	720
attacggggt cacagagttg taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg	780
gatacggcca tgctggccgc ccatcatggg cgcgccactg gattttgggt ttaggaatta	840
gaaattttat tgatagaagt attttacaaa tacaatatata tactaagggt ttcttatatg	900
ctcaacacat gagcgaaacc ctataagaac cctaattccc ttatctggga actactcaca	960
cattattata gagagagata gatttgtaga gagagactgg tgatttcagc gggcatgcct	1020
gcaggctgac tcagatctgg gtaactggcc taactggcct tggaggagct ggcaactcaa	1080
aatccctttg ccaaaaacca acatcatgcc atccaccatg cttgtatcca gctgcgcgca	1140
atgtaccccg ggctgtgtat cccaaagcct catgcaacct aacagatgga tcgtttggaa	1200
ggcctat	1207

<210> 4
 <211> 631
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự có chiều dài gồm 631 nucleotit nằm ở đầu 3' của trình tự được cài vào gần vị trí cài tiếp hợp trong sự kiện đầu tương chuyển gen DBN9004

<400> 4	
gaagaagctg cgctaaaacc ctagccgcaa gagaagaaga gtgaacaaag gtgtgaagag	60
aagtaatgcg acgaggggta gagggtttat ttatagctac aactcttttc ttctgtttac	120
gaaattaccc ttactaatat accctagttc cgtttgtatc cttctctgct ttctgtagcga	180
caattgaaac gctcgctaaa gcgcgtgctt ctacgtctc gtagttaagc ttgataacgc	240
ggcgcgtcta gggcgcgccg ggtcccgttt aaactatcag tgtttgaaga catatttttg	300
tggatctagg ttcatcacct acatcttttt ctttctatct taatttaaatt atttggttaa	360
ttctcattaa ttttctttcg gtcatttctt tccacataat taccatttaa atttgagtaa	420
ctacagctct aaaaatcttt tttttaaaat gataattatt acaacaacaa caacaacaac	480
aacgccttat ccactaggt ggggtcgact acatggatca acttccgtca taatgttcta	540
tcaagtacca tacttctatc caaatcatta agttcgaggt ctttcttgat aacctctctt	600
ataatctttt tgggtcttcc tctgcctcga a	631

<210> 5
 <211> 7059
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Toàn bộ trình tự T-ADN, các trình tự bộ gen của đậu tương liên kế ở đầu 5' và 3'

<400> 5
 atgtttccct ttttcccgac ccacttctcc ttctatccct tcctatttat aacacctaata 60
 tatctatttt attaaagttt tataaataat tcatttatTT aataataata attttttaaa 120
 atataattga tagtatttta ttttattttt taattattta tcaatatatt ctttaaattt 180
 agagtTTTT ttttctaaaa ctgattaata caaaaaacat tataaattaa ttcttctaaa 240
 aaattaaata ttattttaaa cttagtattc ttataaattg gaatagagta ttatactact 300
 cactgttctg tacctttcaa ctttcaattt ggctccctcc actgcttaaa ttctactctc 360
 gtcttccatt actggcgctc ttaattatgc ctttttctta atttcttcat atctcaactc 420
 attcataggc ttttgcttat ttattattac gcaaactcgc ctaacatgta ttttctatta 480
 aattaatcga tcttgtttta ctaggacaaa aacatatttg ttagatgtcg atagattacg 540
 aataatagcg aaagatctga aagaaatttt tcatgttctt ttatgaatat gagtttgact 600
 cttcttaaag ttatataaaa tttcgttggg tggacatttc cttttatgga ttaattacgt 660
 aattgtgacg acatgaaact gcagtttaaa ctactataa tttcttcaat aaatcattac 720
 tacacctgac atagtattta ctatttttaa aagtgtttaa ttttgatta ttattagtgt 780
 aacgaattga attaatattt ttcaaaaaca tcactttttt ataaataaaa tcctaaggaa 840
 taatttatTT tatgggtaga taaaattgat ttaagtaat tgaatgaaat actcatagaa 900
 aacattgaat aaaattggaa actatgtcaa aattaatctc aattattaat tcaaattgga 960
 atacatgctt tttatttatt aaaattacga gaattaaatt tctaacaaaa ataaacagga 1020
 tttgaatttg tttatcaaac atacaattac atttttgagt ttgatcttgt ttatttttaa 1080
 gttgagtaaa actatttttg atataattaa ttttaaaactc ttggacctga ttaaaatata 1140
 tatatatatt aaaatatgta ttcgttatta aaaatacaat acaaagaaaa tagacgggac 1200
 ttgatgaaag aagagcgttg catttacgct ccataaacgt gtgctttcat tacggggtca 1260
 cagagtgtga aacaaattga cgcttagaca acttaataac acattgcgga tacggccatg 1320
 ctggccgccc atcatgggag cgccactgga ttttggtttt aggaattaga aattttattg 1380
 atagaagtat tttacaaata caaatacata ctaagggttt cttatatgct caacacatga 1440
 gcgaaaccct ataagaacc taattccctt atctgggaac tactcacaca ttattataga 1500
 gagagataga tttgtagaga gagactggtg atttcagcgg gcatgcctgc aggtcgactc 1560

agatctgggt aactggccta actggccttg gaggagctgg caactcaaaa tccctttgcc	1620
aaaaaccaac atcatgccat ccaccatgct tgtatccagc tgcgcgcaat gtaccccggg	1680
ctgtgtatcc caaagcctca tgcaacctaa cagatggatc gtttggaagg cctataacag	1740
caaccacaga cttaaaacct tgcgcctcca tagacttaag caaatgtgtg tacaatgtgg	1800
atcctaggcc caacctttga tgccatgtg acacgtaaag agtactctca actgtccaat	1860
cgtaagcgtt cctagccttc cagggcccag cgtaagcaat accagccaca acaccctcaa	1920
cctcagcaac caaccaaggg tatctatctt gcaacctctc tagatcatca atccactctt	1980
gtggtgtttg tggctctgtc ctaaagtcca ctgtagacgt ctcaatgtaa tggttaacga	2040
tatcacaaac cgcggccata tcagctgctg tagctggcct aatctcaact ggtctcctct	2100
ccggagacat ggtggatccc cgggtaccct gtcctctcca aatgaaatga acttccttat	2160
atagaggaag ggtcttgcca aggatagtgg gattgtgcgt catcccttac gtcagtggag	2220
atatcacatc aatccacttg ctttgaagac gtggttgga cgtcttcttt ttccacgatg	2280
ctcctcgtgg gtgggggtcc atctttggga cactgtcgg cagaggcatc ttcaacgatg	2340
gcctttcctt tatcgcaatg atggcatttg taggagccac cttccttttc cactatcttc	2400
acaataaagt gacagatagc tgggcaatgg aatccgagga ggtttcggga tattaccctt	2460
tgttgaaaag tctcaattgc cctttggtct tctgagactg tatctttgat atttttggag	2520
tagacaagcg tgtcgtgctc caccatgttg acgaagattt tcttcttgtc attgagtcgt	2580
aagagactct gtatgaactg ttcgccagtc ttacggcga gttctgttag gtcctctatt	2640
tgaatctttg actccatggc cactgcaggt cacgatcgat gcggccgctt cgagtggctg	2700
caggctcgatt gatgcatggt gtcaatcaat tggcaagtca taaaatgcat taaaaaatat	2760
tttcatactc aactacaaat ccatgagtat aactataatt ataaagcaat gattagaatc	2820
tgacaaggat tctggaaaat tacataaagg aaagttcata aatgtctaaa acacaagagg	2880
acatacttgt attcagtaac atttgcagct tttctaggct tgaaaatata tttgttgcc	2940
agtgaataag cataatggta caactacaag tgttttactc ctcatattaa cttcggtc	3000
tagaggccac gatttgacac atttttactc aaaacaaaat gtttgcatat ctottataat	3060
ttcaaattca acacacaaca aataagagaa aaaacaaata atattaattt gagaatgaac	3120
aaaaggacca tatcatcat taactcttct ccatccattt ccatttcaca gttcgatagc	3180
gaaaaccgaa taaaaaacac agtaaattac aagcacaaca aatggtacaa gaaaaacagt	3240
tttcccaatg ccataatact caaactcagt aggattctgg tgtgtgcgca atgaaactga	3300
tgcatgaac ttgacgaacg ttgtcgaaac cgatgatacg aacgaaagct ctagctagag	3360
gatccggtac cgagctcgaa ttcttgagct catcaagcag ccttagtgct ggagagttcg	3420
atcttagctc caagaccagc catcaaattc atgaactctg ggaagctagt agcgatcata	3480

gtagcatcat caacagtaac agggttttca gaaacgagac ccataacgag gaagctcata	3540
gcgatacggg gatcgagggt ggtagcgaca gctgctccag aagcgttacc gagaccctta	3600
ccgtcaggac gaccacgcac gacgagagaa gtctcacctt catcgcaatc aacaccgttg	3660
agcttgagac cgtttgcgac agcagaaaaga cggtcgcttt ccttaacacg gagttcttcc	3720
aaaccgttca taacggtagc accttcagcg aatgcagctg caacagcgag aattggatac	3780
tcgtcgatca tagaaggagc acggctcttct ggaacagtaa cacccttcaa agtagaagaa	3840
cgaacacgca agtcagccac gtcttctcca ccagcaagac gtgggttgat cacttcgatg	3900
tcggcaccga tttctgcag agtcaagatg agaccagtac gggttgggtt catcaaaacg	3960
ttaaggatgg tgacgtcgga acctggaaca agcaaggcag caaccaatgg gaaagcagta	4020
gaggatggat cacctggaac atcaatcact tgaccgggtga gcttaccacg accttcaaga	4080
cggatggtag gcacaccgtc agcatcagtc tcaacggtaa ggtagcacc aaaaccttga	4140
agcatctttt cagtgtggtc acgagtcagc attggctcga taacagtggg gataacctggg	4200
gtgttgagac cagcaagcag aacagcggac ttcacttgag cggaagccat aggtaccctg	4260
taggtgattg gcgttgaggt ctttggtcca cgcaaggtaa ctggaagacg atcacctct	4320
tcagacttca cctgcacacc catttcgga agtgggttca acacacgacc cattggacgc	4380
ttagtgagag aagcgtcacc aatgaaagtg ctatcgaaat cgtaaacacc aacaagaccc	4440
atagtcaaac ggcaaccagt tgcagcggtt ccgaaatcga gaggagcctc aggagcaagg	4500
agtccaccgt taccaacacc atcaatgatc caagtatcac cttccttacg gattctggca	4560
cccatagctt gcatagcctt accagtgttg ataacatctt caccttccaa aagaccgttg	4620
atacgagttt caccgctagc gagacctcca aacatgaagg acctgtggga gatagacttg	4680
tcacctgga tacggacggg tccagaaaaga ccagaggact tacgagcagt tgctggacgg	4740
ctgcttgac cgtgaagcat gcacgccgtg gaaacagaag acatgacctt aagaggacga	4800
agctcagagc caattaacgt catcccactc ttcttcaatc cccacgacga cgaaatcgga	4860
taagctcgtg gatgctgctg cgtcttcaga gaaaccgata agggagattt gcgttgactg	4920
gatttcgaga gattggagat aagagatggg ttctgcacac cattgcagat tctgctaact	4980
tgcgccatgg cttccttaaa tctgcaaaaa tccagaaaaa aaaaaagttg tcaaaaccat	5040
aacacatcaa cacaccatat aaagtaaaaa taaaagttta acaacattaa gacctttgtc	5100
attacaaaac ctttcataag cataaaaaaga ttaagatcta aatacccacc atacaacaag	5160
cccaaaaata ggtatgctca atcgtaacgc atcaaactca gtatgattcc aacagataaa	5220
aaaatagaca taacaaaatt tatggcactc ccatacataa gatcgagata aaacaagggc	5280
atgttttagca cactgtgacg tatatagatc tattcatcag taaccaaaaa acttgagctt	5340

gaaccgatta aaagtaacag ataatagatc tattcatcag taaccaaaaa acttttagctt	5400
gaatcgatta aagtaacagt taatagatct attcatcagt aaccaaaaaac tttcttgaac	5460
caaaaaactta tataagatct ggatccaaag atttgaatat aacaagcaaa taaaagcctt	5520
accaaaaaaaa ctttaaataa aaagtaataa aaaaaaact tttgaaaaca ccatagcacc	5580
gttattaaca actcgaacga aaagaagaag aataagcaca tactacacaa acaaaattga	5640
tctctgaaac atggataaaa ttgaagacaa cgacgacaga ttcagaaaaa acatattgca	5700
agcaacataa accaatagaa taaacacgaa tagaaggaat aaaatccata gaacggtggt	5760
agataacgaa cctagaagaa gctgcgctaa aaccctagcc gcaagagaag aagagtgaac	5820
aaaggtgtga agagaagtaa tgcgacgagg gtttagagggt ttatttatag ctacaactct	5880
tttcttctgt ttacgaaatt acccttacta atttacccta gttccgtttg tatccttctc	5940
tgctttctgta gcgacaattg aaacgctcgc taaagcgcgt gcttctcacg tctcgtagtt	6000
aagcttgata acgcggccgc tctagggcgc gccgggtccc gtttaaaacta tcagtgtttg	6060
aagacatatt tttgtggatc taggttcac acctacatct ttttcttctc attttaattt	6120
aaatatttgt ttaattctca ttaattttct ttcggtcatt tctttccaca taattacca	6180
ttaaatttga gtaactacag ctctaaaaat ctttttttta aaatgataat tattacaaca	6240
acaacaacaa caacaacgcc ttatcccact aggtggggtc gactacatgg atcaacttcc	6300
gtcataatgt tctatcaagt accatacttc tatccaaatc attaagttcg aggtccttct	6360
tgataaacctc tcttataatc tttttgggtc ttctctgccc tcgaattggt tgctttctct	6420
ccatctggtc tactctctc actacagagt ctaccggttt tctctctaca tgcccaaacc	6480
acctaagtct attttccacc atcttatcta caataggcgc tactccaacc ctctctctaa	6540
tagctccgtt tctaatttta tctgtcgag tcttaccaca catccaccgc aacatcctca	6600
tctccactac acctacttta gtctcatggt ggctcttgac cgcccaacat tctgttccgt	6660
acaaaatcgc cagtcttacc gcagtcctat aaaactttcc ctttagcttg atcggtacct	6720
ttgcatcaca taacaccccc gatgcttttc tccatttcac caatcctgct tgaatgcgat	6780
gattcacatc ccttcaatt tctccatcat cctgtattac agaccaaga tatttaaacc	6840
gtgtgacttg aggataata tggctctcta ttttcacctc tgagttagat accctcctac	6900
ttttgttgaa cttacattcc atatactccg atttgcttct gcttaggcga aagccatgtg	6960
tttctagagc tcgtctccaa gtttccaacc tctcattcaa ctctccctc gactctccaa	7020
ggaggactat gtcactaca aaaagcatgc atctcggcg	7059

<210> 6

<211> 132

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mà nằm trong SEQ ID NO: 3 và liên kết trình tự nucleotit trong trình tự ADN cấu trúc pDBN4003 và trình tự kết thúc phiên mã t35S

<400> 6

taaacaaatt gacgcttaga caacttaata acacattgcg gatacggcca tgctggccgc 60

ccatcatggg cgcgccactg gattttgggt ttaggaatta gaaattttat tgatagaagt 120

attttacaaa ta 132

<210> 7

<211> 118

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mà nằm trong SEQ ID NO: 4 và liên kết trình tự khởi đầu prGml7gTsfl và trình tự nucleotit trong trình tự ADN cấu trúc pDBN4003

<400> 7

tttcgtagcg acaattgaaa cgctcgctaa agcgcggtgt totcacgtct cgtagttaag 60

cttgataacg cggccgtct agggcgcgcc ggtcccgtt taaactatca gtgtttga 118

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<400> 8

cgatagatta cgaataatag 20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

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

<400> 9

ataggccttc caaacgatcc 20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi thứ nhất khuếch đại SEQ ID NO: 4

<400> 10

gaagaagctg cgctaaaacc 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi thứ hai khuếch đại SEQ ID NO: 4

<400> 11
 ttcgaggcag aggaagaccc 20

<210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi trên trình tự bộ gen liền kề ở đầu 5;⁻

<400> 12
 acaatacaaaa gaaaatagac gggac 25

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN và bắt cặp với SEQ ID NO: 12

<400> 13
 gagcatataa gaaaccctta gtatg 25

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi trên trình tự bộ gen liền kề 3;⁻, mà bắt cặp với SEQ ID NO: 12 để phát hiện liệu gen chuyển là đồng hợp tử hay dị hợp tử

<400> 14
 gggcatgtag agagaaaacc g 21

<210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN và bắt cặp với SEQ ID NO: 14

<400> 15
 attgaaacgc tcgctaaagc 20

<210> 16

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi Taqman 1 dùng để phát hiện EPSPS

 <400> 16
 ttggtgctaa ccttaccggt gag 23

 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi Taqman 2 dùng để phát hiện EPSPS

 <400> 17
 gcttaccacg accttcaaga cg 22

 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mẫu dò Taqman 1 dùng để phát hiện EPSPS

 <400> 18
 ctgatgctga cgggtgtgcgt accatc 26

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi Taqman 3 dùng để phát hiện PAT

 <400> 19
 cagttgagat taggccagct acag 24

 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi Taqman 4 dùng để phát hiện PAT

 <400> 20
 ttcactgtag acgtctcaat gtaatgg 27

 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mẫu dò Taqman 2 dùng để phát hiện PAT

<400> 21
 cagctgatat ggccgcgggtt tgtg 24

<210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi thứ nhất của gen nội sinh đậu tương của ubiquitin

<400> 22
 agcatttgaa ctacattctc cttga 25

<210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi thứ hai của gen nội sinh đậu tương của ubiquitin

<400> 23
 tgcagctaca caaatctaaa tcc 23

<210> 24
 <211> 506
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mẫu dò của EPSPS dùng để phát hiện trong lai thẩm tách Nam

<400> 24
 ccacgacctt caagacggat ggtacgcaca ccgtcagcat cagtctcaac ggtaagggtta 60
 gcacaaaaac cttgaagcat cttttcagtg tggtcacgag tcatgattgg ctcgataaca 120
 gtggtgatac ctgggggtgtt gagaccagca agcagaacag cggacttcac ttgagcggaa 180
 gccataggta ccctgtaggt gattggcggt ggagtctttg gtccacgcaa ggtaactgga 240
 agacgatcac cgtottcaga cttcacctgc acaccattt cgcgaaagtgg gttcaacaca 300
 cgaccatttg gacgcttagt gagagaagcg tcaccaatga aagtgcctatc gaaatcgtaa 360
 acaccaacaa gaccatagt caaacggcaa ccagttgcag cgttaccgaa atcgagagga 420
 gcctcaggag caaggagtcc accgttacca acaccatcaa tgatccaagt atcaccttcc 480
 ttacggattc tggcaccat agcttg 506

<210> 25
 <211> 310
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mẫu dò của PAT dùng để phát hiện trong lai thẩm tách Nam

<400> 25

```
cagacttaaa accttgcgcc tccatagact taagcaaag tgtgtacaat gtggatccta      60
ggcccaacct ttgatgccta tgtgacacgt aaacagtact ctcaactgtc caatcgtaag      120
cgttcctagc cttccagggc ccagcgtaag caataccagc cacaacaccc tcaacctcag      180
caaccaacca agggatatcta tcttgcaacc tctctagatc atcaatccac tcttgtgggtg      240
tttgtggctc tgtcctaaag ttcactgtag acgtctcaat gtaatggta acgatatcac      300
aaaccgcggc                                     310
```

<210> 26

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN cùng chiều với SEQ ID NO: 13

<400> 26

```
gggttcttat agggtttcgc tcatg                                     25
```

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ngược chiều với SEQ ID NO: 13 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kế

<400> 27

```
gcctcatgca acctaacaga tgg                                     23
```

<210> 28

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi nằm trên T-ADN ngược chiều với SEQ ID NO: 13 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kế

<400> 28

```
ccaacatcat gccatccacc a                                     21
```

<210> 29

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

33582

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

<400> 29

cctagttccg tttgtatcct tctctgc

27

<210> 30

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi năm trên T-ADN ngược chiều với SEQ ID NO: 15 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kế

<400> 30

gtttgtgtag tatgtgctta ttctttcttc

29

<210> 31

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi năm trên T-ADN ngược chiều với SEQ ID NO: 15 và được sử dụng để tạo ra trình tự liên kế

<400> 31

ctgaatctgt cgctggtgtc ttc

23