



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0034030

(51)⁷ C12C 12/00; A01H 5/08; A01H 5/10; (13) B
A23L 1/10; A23L 1/185; C12Q 1/68;
C12C 1/02; C12N 15/09; C12N 5/10;
A01H 5/00; A23L 1/202

(21) 1-2016-00155

(22) 13/06/2014

(86) PCT/AU2014/000619 13/06/2014

(87) WO/2014/197943 18/12/2014

(30) 2013902140 13/06/2013 AU; 2013902565 11/07/2013 AU

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/07/2016 340A

(73) 1. COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH
ORGANISATION (AU)

Limestone Avenue, Campbell, Australian Capital Territory 2612, Australia

2. GRAINS RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION (AU)

Level 4, 4 National Circuit, Barton, Australian Capital Territory, Australia

(72) TANNER, Gregory John (AU); HOWITT, Crispin Alexander (AU); COLGRAVE,
Michelle Lisa (AU); BLUNDELL, Malcolm James (AU).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK
CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THÀNH PHẦN THỰC PHẨM TỪ CÂY LÚA
MẠCH CHỨA HORDEIN VỚI HÀM LƯỢNG THẤP, CÂY LÚA MẠCH VÀ SẢN
PHẨM ĐƯỢC TẠO RA TỪ CÂY LÚA MẠCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha
thích hợp cho đối tượng mắc bệnh tiêu chảy mỡ sử dụng. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến
phương pháp sản xuất thức ăn hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha chứa hordein với hàm
lượng rất thấp. Sáng chế còn đề cập đến cây lúa mạch tạo ra hạt có thể được sử dụng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha thích hợp cho đối tượng mắc bệnh tiêu chảy mỡ sử dụng. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất thức ăn hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha chứa hordein với hàm lượng rất thấp. Sáng chế còn đề xuất cây lúa mạch sinh ra hạt có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh tiêu chảy mỡ (CD: Coeliac disease) là một bệnh lý đường ruột qua trung gian tế bào T gây ra bởi sự sử dụng prolamin có trong các loại hạt như lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen. Các triệu chứng lâm sàng của bệnh CD bao gồm mệt mỏi, tiêu chảy, chướng bụng, giảm cân, thiếu máu và rối loạn thần kinh (Green et al., 2006). CD có liên quan đến tỷ lệ gia tăng bệnh ác tính đường ruột, như nguy cơ mắc bệnh ung thư ruột tăng gấp 10 lần, nguy cơ mắc u lymphô không Hodgkin tăng từ 3 đến 6 lần và nguy cơ mắc u lymphô tế bào T ruột tăng gấp 28 lần (Green et al., 2009) cũng như tăng tỷ lệ bệnh thiếu máu, chứng loãng xương, thiếu hụt thần kinh, và các rối loạn tự miễn khác như bệnh đái tháo đường (Skovbjerg et al., 2005). Trong trường hợp của prolamin được nghiên cứu nhiều nhất, α -gliadin, độc tính phần lớn qua trung gian bởi một glutamin duy nhất trong một peptit duy nhất (Anderson et al., 2000; Shan et al., 2002) tạo ra một loạt các phản ứng phá hủy mà cuối cùng phá hủy lông nhung của ruột non, giảm sự hấp thu chất dinh dưỡng và tác động lên sức khỏe. Các epitop độc hại của bệnh tiêu chảy mỡ đối với tất cả các protein prolamin đã biết của lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen hiện nay đã được lập bản đồ rộng rãi bằng cách sử dụng quần thể tế bào T không dịch chuyển phân lập từ máu ngoại biên chứa HLA-DQ2⁺ ở người bị bệnh tiêu chảy mỡ sau một khoảng thời gian ngắn thử thách bởi chế độ ăn kiêng bằng lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen (Tye-Din et al., 2010). Ngạc nhiên là, chỉ ba peptit có tính sinh miễn dịch cao, được tạo ra từ α -gliadin (ELQFPQPPELPYPQPQ, SEQ ID NO: 1), ω -gliadin/C-hordein (EQFPQPPEQFPWQP, SEQ ID NO: 2), và B-hordein (EPEQPIPEQPYPYPQQ, SEQ ID NO: 3), có thể giải thích nguyên nhân của 90% phản

ứng đặc hiệu của bệnh tiêu chảy mỡ, gây ra bởi sự bổ sung đầy đủ của các protein của lúa mì, lúa mạch và lúa mạch đen.

Biện pháp điều trị bệnh CD duy nhất hiện nay là suốt đời tránh sử dụng gluten thô chứa họ các protein tương tự được tìm thấy trong lúa mì (gliadin, glutenin), lúa mạch đen (secalin), lúa mạch (hordein), và yến mạch (avenin). Tuy nhiên, các chế độ ăn uống này rất tốn kém (Lee et al., 2007) và đi kèm với việc hấp thu lượng chất xơ thấp và lượng đường cao (Kupper et al., 2005; Wild et al., 2010; Ohlund et al., 2010), nên các chế độ ăn uống này lại gây nhiều nguy cơ với sức khỏe. Việc tránh sử dụng gluten thô dẫn đến sự bình thường hóa các số liệu thống kê sức khỏe trong hầu hết các trường hợp, nhưng không phải trong tất cả các trường hợp mắc bệnh tiêu chảy mỡ (Lanzini et al., 2009; Rubio-Tapia et al., 2010). Khoảng 1% dân số trên toàn thế giới mắc bệnh tiêu chảy mỡ, tuy nhiên, có tới 50% người trưởng thành vẫn không được chẩn đoán hoặc không thể hiện các triệu chứng hiển nhiên (Catassi et al., 1994; Fowell et al., 2006).

Họ chính của các protein có trong hạt ngũ cốc của bộ Triciceae là albumin, globulin và protein kiểu gluten, được gọi chung là prolamin (Shewry and Tatham, 1990). Albumin và globulin được phân bố rộng rãi trong số các cây ra hoa, nhưng prolamin chỉ được phát hiện ở cỏ, cụ thể là họ phụ Pooideae (Hausch et al., 2002). Prolamin, được gọi tên như vậy vì chúng chứa prolin và glutamin của axit amin với tỷ lệ cao, kháng với sự hủy protein trong quá trình cắt (Hausch et al., 2002). Đầu tiên gen α -gliadin là gen prolamin đầu tiên được tách dòng và hiện nay đã biết về vai trò của protein này trong bệnh tiêu chảy mỡ (Kasarda et al., 1984). Độc tính của prolamin này được tập trung ở peptit riêng lẻ 57-QLQFPQPQLPYPQPQS-73 (SEQ ID NO: 4) có gốc glutamin Q65 là axit amin chủ yếu. Sự đột biến của glutamin riêng lẻ này, ví dụ, thành lysin, phá hủy độc tính đối với đường ruột của prolamin này (Anderson et al., 2000). Các peptit được thủy phân một phần vượt qua biểu mô và xâm nhập vào lớp đệm niêm mạc bằng cơ chế chưa được biết đến; ở đây, Q65 được loại amin bởi transglutaminaza mô (tTG) thành E65 (glutamat), làm tăng khả năng kích thích miễn dịch của peptit (Skovbjerg et al., 2004). Điện tích âm tạo điều kiện thuận lợi cho sự gắn kết của peptit với thụ thể DQ2 (hoặc ít phổ biến hơn là với thụ thể DQ8) trên bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên (Antigen Presenting Cell), cho phép trình diện peptit cho tế bào T CD4+, được giới hạn bởi DQ2, đặc hiệu gluten cụ thể, có đích là ruột. Tế bào CD4-T được hoạt hóa theo cách như vậy trải qua quá trình mở rộng vô tính

và lần lượt hỗ trợ sự mở rộng của tế bào B đặc hiệu gluten và đặc hiệu TG2 cùng với sự sinh ra kháng thể kháng TG2 và kháng gluten đặc trưng của bệnh tiêu chảy mỡ. Đáp ứng Th1 qua trung gian tế bào cũng xảy ra, nhờ sự tiết các xytokin viêm (Tjon et al., 2010). Do đó, một tương tác protein duy nhất, được tạo điều kiện thuận lợi bởi việc đưa vào gốc mang điện âm duy nhất, khơi mào một loạt các tăng đặc hiệu và có đích, cuối cùng là dẫn đến sự phá hủy lông nhung ruột.

Lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.) là một loại ngũ cốc được trồng rộng rãi được sử dụng để tạo ra mạch nha cho ngành công nghiệp rượu-bia và thực phẩm. Lúa mạch đã được mạch nha hóa là thành phần chính trong bia, cung cấp nguồn carbohydrat để lên men. Không may là đối với đường ruột, bia làm từ lúa mạch cũng chứa hordein (gluten) với lượng nhỏ nhưng lại độc hại đối với đường ruột (Dostalek et al., 2006). Lượng hordein chiếm một nửa lượng protein có trong hạt lúa mạch (Moravcova et al., 2009), và được cấu thành bởi bốn họ đa gen: B-hordein (30-45kDa; chiếm 70% hàm lượng hordein) và C-hordein (45- 75kDa; chiếm 20% hàm lượng hordein) là các hordein chiếm ưu thế trong hạt, trong lúc đó D- (105kDa) và γ -hordein (35-40kDa) là các thành phần thứ yếu (Shewry et al., 1999). Cao lương, kê, và kiều mạch đã được mạch nha hóa được sử dụng làm nguồn nguyên liệu thay thế không chứa gluten để sản xuất bia (Wijngaard et al., 2007), tuy nhiên, khó lặp lại chất lượng và quá trình sản xuất bia từ lúa mạch có chi phí thấp bằng các hạt này.

Định nghĩa chuẩn của WHO đối với thực phẩm không chứa gluten được chấp nhận bởi Ủy ban tiêu chuẩn thực phẩm Codex (Codex Alimentarius) năm 2008 đòi hỏi rằng thực phẩm được sản xuất từ ngũ cốc như lúa mì và lúa mạch phải chứa gluten với hàm lượng dưới 20mg/kg (20ppm) để được dán nhãn là “không chứa gluten”. Phương pháp định lượng chính xác để đánh giá hàm lượng gluten của thực phẩm và đồ uống là sử dụng phương pháp phổ khối được báo cáo bởi Colgrave et al. (2012).

WO2009/021285 mô tả quá trình tạo ra hạt lúa mạch có hàm lượng hordein giảm đến nhỏ hơn 10% so với mức kiểu dại, cụ thể là về hordein B và C. Tuy nhiên, vẫn cần đến hạt có hàm lượng hordein thấp hơn nhiều để sản xuất thực phẩm và đồ uống mà có thể được sử dụng bởi người mắc bệnh CD.

Do đó, cần đến lúa mạch có hàm lượng hordein gây bệnh CD gần như là thấp nhất mà có thể được sử dụng trong thực phẩm và đồ uống cho đối tượng dễ mắc bệnh CD.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Tác tác giả sáng chế đã tạo ra hạt lúa mạch chứa hordein với hàm lượng rất thấp. Hạt này có thể được sử dụng để sản xuất rất nhiều loại thực phẩm và đồ uống trên cơ sở mạch nha mà có thể được sử dụng bởi đối tượng mắc bệnh tiêu chảy mỡ.

Theo khía cạnh đầu tiên, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thành phần thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, hoặc thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (i) xử lý hạt lúa mạch để tạo ra mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám, và/hoặc (ii) trộn hạt lúa mạch, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên với ít nhất một thành phần thực phẩm hoặc đồ uống khác, trong đó hạt lúa mạch, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám này chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50ppm, bằng cách đó sản xuất thành phần thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thành phần thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, hoặc thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (i) xử lý hạt lúa mạch chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm để tạo ra mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám, và/hoặc (ii) trộn hạt lúa mạch, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên với ít nhất một thành phần thực phẩm hoặc đồ uống khác, trong đó hạt lúa mạch, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám này chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50ppm, bằng cách đó sản xuất thành phần thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha.

Theo một phương án, hạt, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5ppm, nằm trong khoảng từ 0,05ppm đến 50ppm, hoặc từ 0,05ppm đến 20ppm, từ 0,05ppm đến 10ppm, từ 0,05ppm đến 5ppm, từ 0,1ppm đến 5ppm, bằng khoảng 3,9ppm, hoặc bằng khoảng 1,5ppm.

Theo phương án khác, trọng lượng trung bình của hạt bằng ít nhất khoảng 35mg, ít nhất khoảng 39mg, ít nhất khoảng 41mg, ít nhất khoảng 47mg, nằm trong khoảng từ 35mg đến 60mg, từ 40mg đến 60mg, từ 45mg đến 60mg, bằng khoảng 39,1mg, bằng

khoảng 41,8mg hoặc bằng khoảng 47,2mg.

Theo phương án khác nữa, hạt, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, và trọng lượng trung bình của hạt nằm trong khoảng từ 40mg đến 60mg. Theo phương án khác, hạt, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, và trọng lượng trung bình của hạt nằm trong khoảng từ 45mg đến 60mg. Việc đề cập cụ thể đến các hỗn hợp này không loại trừ các hỗn hợp khác có các dấu hiệu này.

Theo phương án khác nữa, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, nằm trong khoảng từ 80% đến 98%, hoặc từ 80% đến 93%, hạt không đi qua rây có kích thước mắt lưới 2,8mm.

Theo phương án khác nữa, hạt, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, trọng lượng trung bình của hạt nằm trong khoảng từ 40mg đến 60mg, và ít nhất khoảng 80% hạt không đi qua rây có kích thước mắt lưới 2,8mm. Theo một phương án khác, hạt, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, trọng lượng trung bình của hạt nằm trong khoảng từ 45mg đến 60mg, và ít nhất khoảng 80% hạt không đi qua rây có kích thước mắt lưới 2,8mm. Việc đề cập cụ thể đến các hỗn hợp này không loại trừ các hỗn hợp khác có các dấu hiệu này.

Thậm chí theo phương án khác nữa, hạt có nguồn gốc từ cây có chỉ số thu hoạch bằng ít nhất 40%, nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, từ 40% đến 55%, hoặc từ 40% đến 50%. Theo phương án được ưu tiên, hạt có nguồn gốc từ cây có chỉ số thu hoạch nằm trong khoảng từ 40% đến 50%

Theo phương án khác, hạt có tỷ số độ dài/độ dày nhỏ hơn khoảng 5, nhỏ hơn khoảng 4, nhỏ hơn khoảng 3,8, từ 2 đến 5, hoặc từ 2,5 đến 3,8.

Theo phương án khác nữa, bột hoặc bột nguyên cám được tạo ra từ hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5ppm, nằm trong khoảng từ 0,05ppm đến 10ppm, hoặc từ 0,05ppm đến 5ppm, bằng khoảng 3,9ppm, hoặc bằng khoảng 1,5ppm.

Theo một phương án, mạch nha hoặc hèm rượu được tạo ra từ hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn khoảng 50ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 20ppm.

Theo phương án khác nữa, hạt, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên

cám tạo ra từ hạt nêu trên, có mức kiểu đại nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc không chứa, một hoặc nhiều hơn một hoặc toàn bộ các hordein:

- i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,
- ii) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,
- iii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
- iv) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56,

trong đó mỗi mức nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2% là so với hạt lúa mạch, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám kiểu đại tạo ra từ hạt nêu trên, của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

Theo một phương án, B-hordein là ít nhất B1-hordein (ví dụ chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 78) và B3-hordein (ví dụ chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 79). Theo một ví dụ khác, C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 80. Theo một ví dụ khác, D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 76.

Theo một phương án, hạt, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, còn có mức kiểu đại nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc không chứa:

i) γ -hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 57, và/hoặc

ii) protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 52,

trong đó mỗi mức nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2% là so với hạt lúa mạch, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám kiểu đại tạo ra từ hạt nêu trên, của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander. Theo một ví dụ, γ -hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 81. Theo một ví dụ khác, protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO: 84.

Theo phương án nêu trên, tốt hơn là γ -hordein là γ 1-hordein và γ 2- hordein.

Theo một phương án, hạt đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ, hoặc trong đó mạch nha, hèm rượu, bột

hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ.

Theo phương án khác, hạt đồng hợp tử về alen vô hiệu của gen mã hóa D- hordein tại locus *Hor3*, hoặc trong đó mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen vô hiệu của gen mã hóa D- hordein, tốt hơn là alen vô hiệu này chứa codon kết thúc, đột biến vị trí cắt, đột biến lệch khung đọc, đoạn xen, đoạn khuyết hoặc mã hóa D-hordein đã được cắt ngắn, hoặc, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa D-hordein đã được loại bỏ.

Theo phương án khác nữa, D-hordein đã được cắt ngắn có codon kết thúc bộ ba mã hóa axit amin số 150.

Theo một phương án khác, hạt đồng hợp tử về alen ở locus *Lys2* của lúa mạch sinh ra hạt không chứa C-hordein, hoặc trong đó mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen ở locus *Lys3*.

Theo phương án khác nữa, hạt, mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,01%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,007%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,0027%, nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1%, từ 0,001% đến 0,01%, bằng khoảng 0,007%, hoặc bằng khoảng 0,0027%, khi so với hạt thu được từ cây lúa mạch kiểu đại tương ứng hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám được tạo ra theo cách tương tự từ hạt thu được từ cây lúa mạch kiểu đại tương ứng.

Theo một phương án khác nữa, hiệu suất hạt có nguồn gốc từ cây bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, nằm trong khoảng từ 60% đến 100%, từ 70% đến 100%, từ 80% đến 100%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, hoặc khoảng 90% hiệu suất hạt của cây lúa mạch kiểu đại.

Theo một phương án khác, trọng lượng trung bình của hạt bằng ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc bằng khoảng 100%, hạt của cây lúa mạch kiểu đại.

Thậm chí theo phương án khác nữa, hạt, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, chứa một hoặc nhiều hơn một hoặc toàn bộ các hordein sau với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, hoặc từ 0,1% đến 10%, khi so với cây lúa mạch kiểu đại tương ứng;

- i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,
- ii) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,
- iii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
- iv) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56.

Theo một phương án khác, hạt, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, còn chứa các chất sau với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, hoặc từ 0,1% đến 10%, khi so với cây lúa mạch kiểu đại tương ứng:

- i) γ -hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:57, và/hoặc
- ii) protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:52.

Theo một phương án khác, hạt, hoặc mạch nha, hèm rượu, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, còn chứa γ 3-hordein, với lượng nhỏ hơn hoặc bằng 60% khi so với lượng γ 3-hordein ở cây lúa mạch kiểu đại tương ứng, γ 3-hordein chứa axit amin có trình tự được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:58, như γ 3-hordein chứa axit amin có trình tự được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:83.

Ví dụ về cây lúa mạch kiểu đại bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

Theo một phương án khác, hàm lượng tinh bột của hạt bằng ít nhất khoảng 50% (trọng lượng). Tốt hơn nữa là, hàm lượng tinh bột của hạt nằm trong khoảng từ 50% đến 70% (trọng lượng).

Theo phương án khác nữa, độc tính đối với đường ruột của bột được tạo ra từ hạt nhỏ hơn khoảng 5%, hoặc nhỏ hơn khoảng 1%, so với bột được tạo ra từ hạt của cây lúa mạch kiểu đại tương ứng.

Theo phương án khác nữa, trọng lượng hạt trung bình ít nhất cao gấp khoảng 1,05 lần, ít nhất khoảng 1,1 lần hoặc nằm trong khoảng từ 1,05 đến 1,3 lần hạt:

- i) đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ,
- ii) đồng hợp tử về alen ở locus *Lys2* của lúa mạch sinh ra hạt thiếu C hordein, và
- iii) đồng hợp tử về alen kiểu đại của D hordein mã hóa protein có chiều dài đầy đủ.

Thậm chí theo phương án khác nữa, hạt có nguồn gốc từ cây có hiệu suất hạt gấp

ít nhất khoảng 1,20 lần, hoặc ít nhất khoảng 1,35 lần, hoặc nằm trong khoảng từ 1,2 đến 1,5 lần, hoặc từ 1,2 đến 2,0 lần so với hạt thu được từ cây:

i) đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ,

ii) đồng hợp tử về alen ở locus *Lys2* của lúa mạch sinh ra hạt thiếu C hordein, và

iii) đồng hợp tử về alen kiểu dại của D hordein mã hóa protein có chiều dài đầy đủ.

Ví dụ, về hai phương án nêu trên, hạt có các dấu hiệu như được xác định trong các phân tử i) đến iii) có thể là hạt G1* được mô tả trong WO 2009/021285.

Theo một phương án khác, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, hoặc ít nhất khoảng 95%, hệ gen của hạt lúa mạch giống với hệ gen của giống lúa mạch kiểu dại như, nhưng không chỉ giới hạn ở, Sloop, Hindmarsh, Oxford hoặc Maratime.

Theo một phương án, hạt có nguồn gốc từ cây không chuyển gen. Theo một phương án khác, hạt có nguồn gốc từ cây chuyển gen.

Theo một phương án khác, cây chứa gen chuyển mã hóa polynucleotit điều hòa giảm sự tạo ra của ít nhất một hordein trong hạt. Tốt hơn, là polynucleotit theo phương án này là polynucleotit đối nghĩa, polynucleotit có nghĩa, polynucleotit xúc tác, microARN nhân tạo hoặc phân tử ARN sợi kép điều hòa giảm sự biểu hiện của một hoặc tốt hơn là nhiều gen mã hóa hordein.

Theo một phương án khác, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước tạo ra bột hoặc bột nguyên cám từ hạt.

Theo một phương án khác nữa, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước tạo ra mạch nha từ hạt.

Theo một phương án, đồ uống trên cơ sở mạch nha là bia và phương pháp theo sáng chế bao gồm bước làm nảy mầm hạt hoặc hạt vỡ được tạo ra từ đó. Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế còn bao gồm bước chia hạt đã được làm nảy mầm và làm khô thành hai hoặc nhiều trong số phân đoạn nội nhũ, phân đoạn lớp nội mô, phân đoạn vỏ, phân đoạn mầm ngọn cuộn, và phân đoạn mạch nha có rễ con; và bước phối hợp và bước trộn các lượng đã định của hai hoặc nhiều phân đoạn.

Theo một phương án, ít nhất khoảng 50% hạt nảy mầm trong 3 ngày sau khi ngâm.

Theo một phương án khác nữa, thành phần thực phẩm hoặc thành phần đồ uống

trên cơ sở mạch nha là bột, tinh bột, mạch nha, hoặc hèm rượu, hoặc trong đó thực phẩm là bánh mì có sử dụng bột nổi hoặc không sử dụng bột nổi, mì ống, mì sợi, ngũ cốc ăn sáng, thực phẩm ăn nhẹ, bánh ngọt, bánh nướng hoặc thực phẩm chứa nước sốt trên cơ sở bột.

Theo một phương án, đồ uống trên cơ sở mạch nha là bia hoặc rượu uýt-ki.

Theo một phương án, thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha là để cho người sử dụng.

Theo một phương án khác nữa, sau khi sử dụng thực phẩm hoặc uống, ít nhất một triệu chứng của bệnh tiêu chảy mỡ không được phát triển ở bệnh nhân mắc bệnh này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây lúa mạch sinh ra hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50ppm.

Cũng được đề xuất là hạt của cây lúa mạch theo sáng chế.

Hạt theo sáng chế và/hoặc hạt của cây lúa mạch theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều dấu hiệu nêu trên.

Theo một phương án, hạt lúa mạch có khả năng sinh ra cây lúa mạch theo sáng chế

Theo một phương án, hạt được xử lý sao cho nó không thể nảy mầm. Theo một phương án, hạt không có vỏ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt lúa mạch, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) trồng cây lúa mạch theo sáng chế,
- b) thu hoạch hạt, và
- c) tùy ý xử lý hạt.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước trồng ít nhất 10000 cây trên cánh đồng có diện tích ít nhất 1 hecta (10000m²).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất bột, bột nguyên cám, tinh bột, mạch nha, hèm rượu hoặc sản phẩm khác thu được từ hạt theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm các bước;

- a) thu hạt theo sáng chế, và
- b) xử lý hạt để tạo ra bột, bột nguyên cám, tinh bột, mạch nha, hèm rượu hoặc sản phẩm khác.

Cũng được đề xuất là sản phẩm được tạo ra từ cây lúa mạch theo sáng chế, hoặc

hạt theo sáng chế.

Theo một phương án, sản phẩm là thành phần thực phẩm, thành phần đồ uống trên cơ sở mạch nha, sản phẩm thực phẩm hoặc sản phẩm đồ uống trên cơ sở mạch nha.

Theo một phương án, sản phẩm đồ uống trên cơ sở mạch nha là bia hoặc rượu uýt-ki.

Theo một phương án khác nữa, sản phẩm là sản phẩm không phải thực phẩm. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, màng, lớp bao, chất kết dính, vật liệu xây dựng và vật liệu bao gói.

Cũng được đề xuất là thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha được tạo ra bằng cách sử dụng theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bia chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với lượng nhỏ hơn 0,9ppm.

Theo một phương án, bia chứa etanol với lượng bằng ít nhất khoảng 2%, ít nhất khoảng 3%, ít nhất khoảng 4%, hoặc ít nhất khoảng 5%.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bột hoặc bột nguyên cám chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với lượng nhỏ hơn khoảng 50ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 20ppm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất mạch nha hoặc hèm rượu chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với lượng nhỏ hơn khoảng 50ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 20ppm.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định alen của gen D hordein của lúa mạch mã hóa D hordein đã được cắt ngắn, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- i) thu mẫu chứa axit nucleic từ cây lúa mạch, và
 - ii) phân tích mẫu về sự có mặt hoặc không có mặt của gốc guanin ở vị trí 450 của khung đọc mở mã hóa D hordein,
- trong đó sự có mặt của guanin cho biết gen D hordein mã hóa D hordein đã được cắt ngắn.

Theo một phương án, bước b) bao gồm bước khuếch đại ADN hệ gen bằng cách sử dụng đoạn mồi GGCAATACGAGCAGCAAAC (SEQ ID NO: 66) và CCTCTGTCCTGGTTGTTGTC (SEQ ID NO: 67), hoặc biến dị của một hoặc cả hai đoạn mồi nêu trên, và bước cho sản phẩm đã khuếch đại tiếp xúc với enzym giới hạn

KpnI, trong đó sự không có mặt của sự phân cắt cho biết gen D hordein mã hóa D hordein đã được cắt ngắn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tránh hoặc giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy mỡ hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh tiêu chảy mỡ ở đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng sử dụng thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha theo sáng chế, hoặc hạt theo sáng chế qua đường miệng, trong đó sự giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy mỡ hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh tiêu chảy mỡ là so với tỷ lệ hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh tiêu chảy mỡ ở đối tượng sử dụng qua đường miệng cùng một lượng thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha tương ứng được tạo ra từ hạt lúa mạch kiểu đại.

Cũng được đề xuất là việc sử dụng thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha theo sáng chế, hoặc hạt theo sáng chế, để sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống để sử dụng qua đường miệng ở đối tượng để tránh hoặc giảm tỷ lệ mắc bệnh tiêu chảy mỡ hoặc mức độ nghiêm trọng của bệnh tiêu chảy mỡ.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định hạt lúa mạch mà có thể được sử dụng để sản xuất thực phẩm và/hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha để đối tượng mắc bệnh tiêu chảy mỡ sử dụng bao gồm các bước:

a) thu một hoặc nhiều nguyên liệu sau:

- i) mẫu từ cây có khả năng sinh ra hạt nêu trên,
- ii) hạt,
- iii) mạch nha được tạo ra từ hạt, và/hoặc
- iv) dịch chiết của hạt nêu trên,

b) phân tích nguyên liệu thu được từ bước a) về hàm lượng B, C và D hordein, peptit được tạo ra từ B, C và D hordein, và/hoặc về alen của gen B, C và D hordein,

c) lựa chọn hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm để sản xuất thực phẩm và/hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha cho đối tượng mắc bệnh tiêu chảy mỡ sử dụng.

Theo một phương án, nguyên liệu thu được từ bước a) chứa ADN hệ gen và bước b) bao gồm bước xác định sự không có mặt hoặc có mặt của alen của gen mã hóa một hoặc nhiều hoặc toàn bộ:

- i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,
- ii) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,

iii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
 iv) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56,
 trong đó sự không có mặt của các alen xác định hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50ppm.

Phương án bất kỳ ở đây sẽ được lấy để áp dụng với những sửa đổi thích đáng về chi tiết cho phương án bất kỳ khác, trừ khi có quy định cụ thể.

Sáng chế không bị giới hạn ở phạm vi bởi các phương án cụ thể được mô tả ở đây mà được dự định chỉ dùng cho mục đích minh họa. Các sản phẩm, chế phẩm và phương pháp tương đương về mặt chức năng là rõ ràng trong phạm vi của sáng chế, như được mô tả ở đây.

Trong suốt bản mô tả này, trừ khi có quy định cụ thể hoặc ngữ cảnh đòi hỏi theo cách khác, khi nói tới bước duy nhất, chế phẩm, nhóm các bước hoặc nhóm các chế phẩm sẽ được hiểu là bao gồm một và nhiều (nghĩa là một hoặc nhiều) bước, chế phẩm, nhóm các bước hoặc nhóm các chế phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế được mô tả ở đây bằng các Ví dụ không làm hạn chế phạm vi của sáng chế và các hình vẽ đi kèm.

Fig.1 thể hiện sự biểu diễn bằng sơ đồ của nhiễm sắc thể 1 của lúa mạch.

Fig.2 thể hiện sự định lượng hordein tương đối trong bia. Diện tích đỉnh của các peptit đã chọn cho biết hordein hoặc polypeptit có liên quan dư thừa nhiều nhất phát hiện được trong bia (A) QQCCQPLAQISEQAR (SEQ ID NO: 5) thể hiện protein A kiểu avenin; (B) VFLQQQCSPVR (SEQ ID NO: 53) thể hiện B1- hordein; (C) VFLQQQCSPVPMPQR (SEQ ID NO: 54) thể hiện B3-hordein;

(D) ELQESSLEACR (SEQ ID NO: 56) thể hiện D-hordein; và (E) QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID NO: 58) thể hiện γ -hordein-3. Các peptit đại diện này được sử dụng để minh họa lượng tương ứng của protein hordein chủ yếu ở bia được sản xuất từ lúa mạch kiểu đại (Sloop) và hai loại bia có đoạn khuyết hordein được sản xuất từ giống lúa mạch Risø 56 và Risø 1508, tương ứng, và trong bia thương mại 60. Diện tích đỉnh nhỏ được phát hiện đối với bia 17, 47, 49-52, 54 không chứa gluten là do mức nhiễu thấp trong tín hiệu và không phải là do sự phát hiện hordein.

Fig.3 thể hiện sự so sánh các trình tự axit amin của D hordein thu được từ giống lúa mạch Sloop (kiểu đại) và Ethiopia R118 (không chứa D-hordein).

Fig.4. thể hiện sự so sánh trình tự axit amin của D hordin và nucleotit mã hóa thu được từ giống lúa mạch Sloop (kiểu đại) và Ethiopia R118 (không chứa D- hordein). Vị trí của đoạn mồi để phát hiện mỗi alen được thể hiện cùng với vị trí phân cắt Kpn1 chỉ có mặt trong trình tự kiểu đại.

Fig.5 xác định hàm lượng hordein của các dòng ULG3.0 bằng phương pháp MRM MS nhờ diện tích đỉnh, và cho biết tỷ lệ phần trăm so với giống lúa mạch Sloop (100%).

Fig.6 xác định hàm lượng hordein của các dòng ULG3.0 bằng phương pháp MRM MS nhờ diện tích đỉnh, và cho biết tỷ lệ phần trăm so với giống lúa mạch Sloop (100%).

Fig.7 xác định hàm lượng hordein trong bia ULG3.0 bằng phương pháp MRM MS dưới dạng diện tích đỉnh đối với peptit xác định. Diện tích đỉnh được thể hiện, và tỷ lệ phần trăm so với giống lúa mạch Sloop (100%).

Fig.8 cho biết sự phát hiện hordein và protein kiểu hordein bằng phương pháp MRM MS trong bột thu được từ các dòng cạnh tranh ULG3.0 (T2-4-8) và ULG3.2, so sánh với các giống lúa mạch kiểu đại Sloop, Baudin, Commander và Hindmarsh. Mỗi sơ đồ thể hiện giá trị trung bình $\pm$ SD đối với diện tích đỉnh lấy tổng (3 chuyển tiếp MRM) đối với peptit đại diện từ mỗi họ hordein. Trong mỗi trường hợp, peptit (trình tự như được liệt kê trong sơ đồ) so với protein A kiểu avenin, B1-, B3-, C-, D-, γ 1- hoặc γ 3-hordein. Số đăng ký Uniprot được thể hiện trong chú thích (ví dụ, F2EGD5 đối với ví dụ đầu tiên).

Liệt kê danh mục trình tự

SEQ ID NO. 1 và 4: peptit α -gliadin của lúa mì.

SEQ ID NO. 2, 3, 6 đến 11, 16 đến 59 và 85: peptit hordein của lúa mạch. SEQ ID NO. 5: peptit A kiểu avenin của lúa mì.

SEQ ID NO. 12 đến 15: peptit prolamin của lúa mạch đen. SEQ ID NO. 60 đến 71: đoạn mồi oligonucleotit.

SEQ ID NO. 72: vùng hệ gen mã hóa D-hordein của lúa mạch cv. Sloop.

SEQ ID NO. 73: vùng hệ gen mã hóa D-hordein của lúa mạch cv. Ethiopia R118 (không chứa D-hordein).

SEQ ID NO.74: D-hordein của lúa mạch cv. Sloop.

SEQ ID NO. 75: D-hordein của lúa mạch cv. Ethiopia R1118. SEQ ID NO. 74: D-

hordein của lúa mạch cv. Sloop.

SEQ ID NO. 75: D-hordein của lúa mạch cv. Ethiopia R118.

SEQ ID NO. 76: Khung đọc mở mã hóa D hordein của lúa mạch cv. Sloop.

SEQ ID NO. 77: Khung đọc mở mã hóa D hordein của lúa mạch cv. Ethiopia R118.

SEQ ID NO. 78: Ví dụ về B1-hordein của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: Q40020).

SEQ ID NO. 79: Ví dụ về B3-hordein của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: Q4G3S1).

SEQ ID NO. 80: Ví dụ về C-hordein của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: Q40055).

SEQ ID NO. 81: Ví dụ về γ 1-hordein của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: P17990).

SEQ ID NO. 82: Ví dụ về γ 2-hordein của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: Q70IB4).

SEQ ID NO. 83: Ví dụ về γ 3-hordein của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: P80198).

SEQ ID NO. 84: Ví dụ về protein A kiểu avenin của lúa mạch kiểu đại (Số đăng ký: F2EGD5).

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương pháp chung và định nghĩa

Trừ khi có quy định cụ thể, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây sẽ có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực này (ví dụ, trong lĩnh vực nhân giống cây, công nghệ thực phẩm, nuôi cấy tế bào, di truyền phân tử, miễn dịch học, hóa học protein, và hóa sinh).

Trừ khi có chỉ dẫn khác, các kỹ thuật protein tái tổ hợp, nuôi cấy tế bào, và miễn dịch học được sử dụng trong sáng chế là các phương pháp chuẩn mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết. Các phương pháp này được mô tả và giải thích khắp các tài liệu chuyên ngành như, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989),

Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), ADN Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 và 1996), and F.M. Ausubel et al.

(editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, kể cả các bản mới cập nhật cho tới nay), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), và J.E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (kể cả các bản mới cập nhật cho tới nay).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “lúa mạch” được dùng để chỉ loài bất kỳ của giống *Hordeum*, kể cả các loài tổ tiên của chúng, cũng như thế hệ con của chúng được tạo ra bởi sự lai chéo với các loài khác. Dạng được ưu tiên của lúa mạch là loài *Hordeum vulgare*. Hạt của hầu hết các cây lúa mạch được phát triển thương mại trên thế giới ngày nay có quả thóc được bao (bao trấu) mà được gọi là vỏ trấu, là mày ngoài và mày trong, được kết hợp thành vỏ quả khi trưởng thành. Các cây trồng khác, được gọi là lúa mạch không trấu hoặc trần, không phải đập và trấu dễ dàng được loại bỏ trong quá trình đập. Hạt lúa mạch trần được ưu tiên để sử dụng cho người, mặc dù hạt có trấu có thể được sử dụng sau khi xát, trong đó hạt lúa mạch có vỏ trấu là được ưu tiên đối với ngành công nghiệp rượu bia và để làm thức ăn cho động vật. Tính trạng của hạt không trấu được kiểm soát bằng gen lặn duy nhất ký hiệu là *nud* định vị trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 7H (Kikuchi et al., 2003).

Bệnh tiêu chảy mỡ hoặc bệnh Celiac là một rối loạn tự miễn dịch của ruột non xảy ra ở các đối tượng có tổ bẩm di truyền ở tất cả các nhóm tuổi sau trẻ nhũ nhi. Nó ảnh hưởng đến khoảng 1% dân số Ấn-Âu, mặc dù nó chưa được chẩn đoán đáng kể. Bệnh tiêu chảy mỡ gây ra bởi phản ứng của gliadin, một protein gluten tìm thấy trong lúa mì (và các protein tương tự của bộ Triticeae bao gồm các cây trồng khác như lúa mạch và lúa mạch đen). Khi tiếp xúc với gliadin, enzym transglutaminaza mô làm biến đổi protein, và hệ miễn dịch phản ứng chéo với mô ruột, gây ra phản ứng viêm. Điều này dẫn đến việc làm mỏng lớp lót của ruột non, ảnh hưởng đến sự hấp thu chất dinh dưỡng. Biện pháp điều trị hữu hiệu duy nhất là chế độ ăn không có gluten suốt đời. Tình trạng bệnh này có một vài tên khác, bao gồm: bệnh coeliac (có chữ c), bệnh viêm ruột loét miệng c(o)eliac, bệnh viêm ruột loét miệng không nhiệt đới, bệnh viêm ruột loét miệng địa phương, bệnh đường ruột do gluten hoặc bệnh đường ruột do nhạy gluten, và chứng không dung nạp gluten. Các triệu chứng của bệnh tiêu chảy mỡ thay đổi rộng rãi từ người này đến người khác. Các triệu chứng của bệnh tiêu chảy mỡ có thể bao gồm một hoặc nhiều triệu chứng sau: khí, chướng và đau bụng lặp đi lặp lại, tiêu

chảy mạn tính, táo bón, da nhợt nhạt, phân có mùi hôi hoặc có chất béo, giảm cân/tăng cân, mệt mỏi, thiếu máu không rõ nguyên nhân (lượng tế bào hồng cầu thấp gây mệt mỏi), đau xương hoặc khớp, chứng loãng xương, thiếu xương, biến đổi hành vi, tê nhói ở chân (do sự phá hủy dây thần kinh), chuột rút cơ bắp, cơn động kinh, chậm kinh (thường là do sự giảm cân quá mức), vô sinh, sảy thai tái phát, phát triển chậm, không lớn ở trẻ em, có các vết loét nhợt nhạt trong miệng, được gọi là vết loét áp-tơ, biến màu răng hoặc mất men răng, và phát ban ngứa được gọi là viêm da ecpet. Một vài trong số các triệu chứng thông thường hơn bao gồm: mệt mỏi, tiêu chảy gián đoạn, đau hoặc quặn bụng, khó tiêu, đầy hơi, chướng bụng; và giảm cân. Bệnh tiêu chảy mỡ có thể được chẩn đoán, ví dụ, như được mô tả trong WO 01/025793.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “alen vô hiệu của gen mã hóa D- hordein tại locus *Hor3*” được dùng để chỉ alen bất kỳ của locus này không mã hóa protein D- hordein, hoặc nếu một protein được mã hóa nó không có tính sinh miễn dịch cho đối tượng mắc bệnh tiêu chảy mỡ (như D-hordein đã được cắt ngắn được thể hiện trên Fig.3).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thiếu” như được sử dụng ở đây trong ngữ cảnh của chất đã nêu có nghĩa là chất này không có mặt trong hạt lúa mạch, hoặc sản phẩm được tạo ra từ đó, theo sáng chế, hoặc nghĩa là chất này không được phát hiện trong hạt hoặc sản phẩm theo sáng chế khi việc phân tích chất được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Điều đó có nghĩa là chất này có thể có mặt ở mức không đủ để phát hiện, hoặc trong sai số chuẩn của phép phân tích chất đó. Ví dụ, trong ngữ cảnh của hordein đã nêu, thuật ngữ “thiếu” có nghĩa là hordein cụ thể không được phát hiện trong thử nghiệm, ví dụ, như thử nghiệm MRM MS, thử nghiệm ELISA hoặc thử nghiệm điện di 2D-gel, như được lấy ví dụ ở đây. Chất thiếu đó có thể không được phát hiện ở một loại thử nghiệm hoặc trong nhiều loại thử nghiệm. Hiểu được rằng chất được cho là thiếu trong hạt hoặc sản phẩm theo sáng chế sẽ có mặt, như dễ dàng được xác định bằng thử nghiệm đã biết trong lĩnh vực này, trong hạt kiểu dại hoặc sản phẩm tương ứng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “hordein”, ví dụ khi được sử dụng trong cụm từ “hordein với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 50ppm” và các cụm từ tương tự được dùng để chỉ hordein toàn phần bao gồm B-, C-, D- và γ - hordein.

Theo ngữ cảnh, “hạt” thường được dùng để chỉ hạt trưởng thành đã được thu

hoạch nhưng cũng có thể được dùng để chỉ hạt sau khi xử lý, ví dụ, như xát hoặc làm bóng, tại đó phần lớn hạt còn nguyên vẹn, hoặc sau khi ngâm hoặc nảy mầm. Hạt trưởng thành thường có hàm lượng ẩm nhỏ hơn khoảng 18-20%. Hạt lúa mạch kiểu đại (hạt nguyên) thường chứa protein với hàm lượng nằm trong khoảng từ 9 đến 12%, và từ 30-50% protein là prolamin, thông thường là 35%, nên hạt lúa mạch kiểu đại chứa prolamin với lượng nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng. Prolamin được phát hiện là gần như chỉ có trong nội nhũ, phân chiếm 70% trọng lượng hạt nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chỉ số thu hoạch” được dùng để chỉ trọng lượng của hạt đã được thu hoạch dưới dạng phần trăm của tổng trọng lượng của cây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ cây lúa mạch “kiểu đại tương ứng” được dùng để chỉ cây chứa ít nhất khoảng 50%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 97%, tốt hơn nữa là ít nhất 99%, và còn tốt hơn nữa là 99,5% kiểu gen của cây theo sáng chế, nhưng sinh ra hạt có hàm lượng hordein không bị biến đổi. Theo một phương án, cây lúa mạch “kiểu đại tương ứng” là cây trồng được sử dụng trong các thử nghiệm nhân giống cây để sinh ra các biến dị di truyền có sự sản sinh hordein được giảm thiểu trong hạt. Theo phương án khác, cây lúa mạch “kiểu đại tương ứng” là cây trồng bố-mẹ mà gen chuyển được đưa vào làm giảm sự sản sinh hordein trong hạt. Theo phương án khác nữa, cây lúa mạch “kiểu đại tương ứng” là cây trồng được sử dụng ở ngày nộp sản phẩm thương mại của hạt lúa mạch như, nhưng không chỉ giới hạn ở, Bomi, Sloop, Carlsberg II, K8, L1, Vlamingh, Stirling, Hamelin, Schooner, Baudin, Commander, Gairdner, Buloke, WI3586-1747, WI3416, Flagship, Cowabbie, Franklin, SloopSA, SloopVic, Quasar, VB9104, Grimmett, Cameo*Arupo 31-04, Prior, Schooner, Unicorn, Harrington, Torrens, Galleon, Morex, Dhow, Capstan, Fleet, Keel, Maritime, Yarra, Dash, Doolup, Fitzgerald, Molloy, Mundah, Oxford, Onslow, Skiff, Unicorn, Yagan, Chebec, Hindmarsh, Chariot, Diamant, Korál, Rubín, Bonus, Zenit, Akcent, Forum, Amulet, Tolar, Heris, Maresi, Landora, Caruso, Miralix, Wikingett Brise, Caruso, Potter, Pasadena, Annabell, Maud, Extract, Saloon, Prestige, Astoria, Elo, Cork, Extract, Laura. Theo một phương án, cây lúa mạch “kiểu đại tương ứng” sinh ra hạt có hàm lượng hordein không bị biến đổi do nó chứa bộ thể đầy đủ của gen hordein chức năng mã hóa protein hordein chức năng, bao gồm B, C, D và γ -hordein được mã hóa bởi các locus *Hor2*, *Hor1*, *Hor3*, và *Hor5*.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch” được

dùng để chỉ các protein có trong tự nhiên được sinh ra bởi hạt lúa mạch chứ không phải hordein. Ví dụ về các protein này là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các ví dụ cụ thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, albumin lúa mạch như protein chuyển lipid 1 9kDa (LTP1: lipid transfer protein 1) (xem Douliez et al. (2000) và Số đăng ký Swiss-prot No. P07597 là một ví dụ), chất ức chế α -amylaza trypsin (CMd, CMb, CMa), protein Z (xem Brandt et al. (1990) và Số đăng ký Genbank No. P06293), và protein được xác định trong tài liệu Colgrave et al. (2012), kể cả các dạng đã được xử lý (trưởng thành) của chúng, cũng như các dạng biến tính và/hoặc phân đoạn của chúng được tạo ra dưới dạng kết quả của quá trình sản xuất mạch nha, bột, bột nguyên cám, thực phẩm hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha theo sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, “trọng lượng trung bình của hạt” tốt hơn là được xác định bằng cách thu ít nhất 25, ít nhất 50 hoặc ít nhất 100, tốt hơn nữa là khoảng 100, hạt riêng rẽ từ cây (hoặc cây tương tự về mặt di truyền sinh trưởng trong cùng điều kiện) và xác định trọng lượng trung bình của hạt.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mạch nha” được sử dụng để chỉ mạch nha lúa mạch, “bột” để chỉ bột lúa mạch, “bột nguyên cám” để chỉ bột nguyên cám của lúa mạch, và “bia” để chỉ bia được tạo ra bằng cách sử dụng lúa mạch làm thành phần chính của nó tạo ra cacbohydrat có thể lên men được, trừ khi mạch nha, bột, bột nguyên cám hoặc bia được đề cập rõ ràng là có nguồn gốc từ nguồn không phải là lúa mạch. Như được sử dụng ở đây, “hèm rượu” được dùng để chỉ chất lỏng chiết được từ bước ủ trong giai đoạn nấu bia hoặc rượu uýt-ki. Hèm rượu chứa đường sẽ được lên men bằng nấm men bia để tạo ra rượu. Cụ thể hơn, nguồn mạch nha, hèm rượu, bột, bia, bột nguyên cám, sản phẩm thực phẩm, v.v., theo sáng chế có nguồn gốc từ việc xử lý (ví dụ, xát và/hoặc lên men) hạt lúa mạch. Hạt, mạch nha, hèm rượu, bột, bột nguyên cám hoặc bia theo sáng chế có thể được trộn hoặc phối hợp với hạt, mạch nha, hèm rượu, bột, bột nguyên cám hoặc bia mà không được tạo ra từ lúa mạch. Các thuật ngữ này bao gồm mạch nha, hèm rượu, bột, bia, bột nguyên cám, sản phẩm thực phẩm, v.v., được tạo ra từ hỗn hợp các hạt bao gồm lúa mạch. Theo phương án được ưu tiên, ít nhất 10% hoặc ít nhất 50% hạt được sử dụng để tạo ra mạch nha, hèm rượu, bột, bia, bột nguyên cám, sản phẩm thực phẩm, v.v., là hạt lúa mạch.

Thuật ngữ “cây” như được sử dụng ở đây dưới dạng danh từ được dùng để chỉ toàn bộ cây, ví dụ, như cây sinh trưởng trên cánh đồng để sản xuất lúa mạch thương

mại. “Bộ phận của cây” được dùng để chỉ các cấu trúc thực vật của cây (ví dụ, lá, thân), rễ, cơ quan/cấu trúc hoa, hạt (kể cả phôi, nội nhũ, và vỏ hạt), mô cây (ví dụ, mô mạch, mô gốc, và các mô tương tự), tế bào, hạt tinh bột hoặc thể hệ con của chúng.

“Cây chuyển gen”, “cây biến đổi gen” hoặc các biến thể của chúng được dùng để chỉ cây chứa cấu trúc gen (“gen chuyển”) không tìm thấy được trong cây kiểu dại của loài, giống hoặc cây trồng tương tự. “Gen chuyển” được nhắc đến ở đây có nghĩa thông thường trong lĩnh vực công nghệ sinh học và bao gồm trình tự di truyền đã được tạo ra hoặc biến đổi bởi công nghệ ADN hoặc ARN tái tổ hợp và được đưa vào tế bào cây. Gen chuyển có thể bao gồm trình tự di truyền được tạo ra từ tế bào của cây. Thông thường, gen chuyển được đưa vào cây bằng các thao tác của con người, ví dụ, như bằng cách biến nạp nhưng phương pháp bất kỳ có thể được sử dụng theo cách chuyên gia trong lĩnh vực này thừa nhận.

“Phân tử axit nucleic” được dùng để chỉ polynucleotit, ví dụ, như ADN, ARN hoặc oligonucleotit. Nó có thể là ADN hoặc ARN có nguồn gốc hệ gen hoặc tổng hợp, sợi kép hoặc sợi đơn, và phối hợp với cacbohydrat, lipit, protein, hoặc các chất khác để thực hiện một hoạt động cụ thể được xác định ở đây.

“Liên kết điều khiển” như sử dụng trong đây là để chỉ mối liên hệ về mặt chức năng giữa hai hoặc nhiều đoạn axit nucleic (ví dụ, ADN). Thông thường, thuật ngữ này được dùng để chỉ mối liên hệ về mặt chức năng của yếu tố điều hòa phiên mã (gen khởi đầu) với trình tự được phiên mã. Ví dụ, gen khởi đầu được liên kết điều khiển với trình tự mã hóa, như polynucleotit được xác định ở đây, nếu nó kích thích hoặc điều hòa sự phiên mã của trình tự mã hóa trong tế bào thích hợp. Nói chung, các yếu tố điều hòa phiên mã gen khởi đầu được liên kết điều khiển với trình tự được phiên mã là ở cạnh nhau về mặt vật lý với trình tự được phiên mã, tức là, chúng tác động đều (*cis-acting*). Tuy nhiên, một số yếu tố điều hòa phiên mã, như gen tăng cường, cần phải không ở cạnh nhau về mặt vật lý hoặc không đặt gần với trình tự mã hóa mà chúng làm tăng sự phiên mã.

Như sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen” được đưa vào với ý nghĩa rộng nhất của nó và bao gồm trình tự deoxyribonucleotit bao gồm vùng mã hóa protein của gen cấu trúc và bao gồm các trình tự được đặt liền kề với vùng mã hóa trên cả đầu 5’ và 3’ với khoảng cách ít nhất là khoảng 2kb ở cả đầu này và có vai trò trong sự biểu hiện gen. Các trình tự được đặt ở đầu 5’ của vùng mã hóa và có mặt trên mARN được gọi là các

trình tự 5' không dịch mã. Trình tự được đặt ở đầu 3' hoặc xuôi dòng của vùng mã hóa và có mặt trên mARN được gọi là trình tự 3' không dịch mã. Thuật ngữ “gen” bao gồm cả dạng cADN và dạng hệ gen của gen. Dạng hệ gen hoặc dòng vô tính của gen chứa vùng mã hóa có thể bị ngắt quãng bởi các trình tự không mã hóa có tên là “intron” hoặc “vùng xen” hoặc “trình tự xen”. Các intron là các đoạn gen được phiên mã vào trong ARN nhân (hnRNA); các intron này có thể chứa các yếu tố điều hòa như gen tăng cường. Intron được tách riêng ra hoặc “cắt ra” từ sản phẩm phiên mã nhân hoặc sản phẩm phiên mã sơ bộ; do đó các intron là không có trong sản phẩm phiên mã ARN thông tin (mARN). mARN hoạt động trong quá trình dịch mã để xác định rõ trình tự hoặc thứ tự của axit amin trong polypeptit mới sinh. Thuật ngữ “gen” bao gồm phân tử tổng hợp hoặc dung hợp mã hóa toàn bộ hoặc một phần protein theo sáng chế được mô tả ở đây và trình tự nucleotit bổ sung với trình tự bất kỳ nêu trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “thành phần thực phẩm hoặc đồ uống khác” được dùng để chỉ chất bất kỳ thích hợp để sử dụng bởi động vật, tốt hơn, là chất bất kỳ thích hợp để sử dụng bởi con người, khi được cung cấp dưới dạng một phần của thực phẩm hoặc đồ uống. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt thu được từ các loài cây khác, đường, v.v., nhưng không kể nước.

Cây theo sáng chế thường có một hoặc nhiều sự biến dị di truyền mà mỗi biến dị tạo ra hàm lượng giảm của ít nhất một hordein, tốt hơn nữa là ít nhất B, C và D-hordein. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến dị di truyền mà mỗi biến dị tạo ra hàm lượng giảm của ít nhất một hordein” được dùng để chỉ hiện tượng đa hình bất kỳ của cây lúa mạch mà làm giảm sự sản sinh hordein. Biến dị di truyền có thể chứa, ví dụ, đoạn khuyết của gen hordein hoặc một phần của nó, hoặc đột biến làm giảm sự phiên mã gen của lúa mạch. Ví dụ về các biến dị di truyền này có mặt trong giống lúa mạch Risø 56, Risø 527 và Risø 1508 và Ethiopia R118. Do đó, các cây này có thể được sử dụng làm cây bố-mẹ để tạo ra cây theo sáng chế. Cây theo sáng chế có thể tạo ra từ thế hệ con nhờ sự lai giữa thể đột biến bất kỳ trong số các thể đột biến lúa mạch này. Theo phương án được ưu tiên, cây theo sáng chế không phải là thế hệ con nhờ sự lai giữa giống lúa mạch Risø 56 và Risø 1508 chứa các thể đột biến *hor2* và *lys3* có mặt trong các dòng này và là kiểu đại đối với gen mã hóa D-hordein. Theo một phương án, cây mã hóa $\gamma 3$ -hordein chứa axit amin có trình tự được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:58, như $\gamma 3$ -hordein chứa axit amin có trình tự được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:83. Ví dụ, cây có

thể có gen γ 3-hordein kiểu đại chức năng như gen γ 3-hordein của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander. Theo một phương án, cây không phải là thể hệ con nhờ sự lai giữa Risø 527 và Risø 1508.

Như được sử dụng ở đây, trừ khi có quy định khác, cụm từ “khoảng” được dùng để chỉ khoảng hợp lý bất kỳ của giá trị quan tâm. Theo phương án được ưu tiên, thuật ngữ “khoảng” được dùng để chỉ $\pm 10\%$, tốt hơn nữa là $\pm 5\%$, tốt hơn nữa là $\pm 1\%$, giá trị cụ thể.

Trừ khi được xác định theo cách khác, khi nói về trọng lượng và phần trăm, đơn vị là trọng lượng.

Thuật ngữ “và/hoặc”, ví dụ, “X và/hoặc Y” sẽ được hiểu có nghĩa là “X và Y” hoặc “X hoặc Y” và có thể được sử dụng để mang lại sự hỗ trợ rõ ràng cho cả hai nghĩa hoặc cho mỗi nghĩa.

Trong suốt bản mô tả, từ “bao gồm”, hoặc các từ tương tự như “chứa”, sẽ được hiểu là ngụ ý sự gồm có một yếu tố, số nguyên hoặc bước đã nêu, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước, nhưng không có nghĩa loại trừ yếu tố, số nguyên hoặc bước bất kỳ khác, hoặc nhóm các yếu tố, số nguyên hoặc bước.

Prolamin và hordein

Prolamin ngũ cốc (được biết đến là gliadin trong lúa mì, hordein trong lúa mạch, secalin trong lúa mạch đen, avenin trong yến mạch, và zein trong ngô) là protein dự trữ nội nhũ chủ yếu trong tất cả các loại hạt ngũ cốc, ngoại trừ yến mạch và gạo (Shewry and Halford, 2002). Hordein có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 35 đến 50% protein toàn phần trong hạt lúa mạch (Jaradat, 1991). Chúng được phân loại thành bốn nhóm, A (còn được gọi là γ hordein), B, C, và D, theo hoạt tính giảm (Field et al., 1982). B, C, D và γ -hordein được mã hóa bởi các locus *Hor2*, *Hor1*, *Hor3*, và *Hor5*, tương ứng, trên nhiễm sắc thể 1H như được thể hiện bằng sơ đồ trên Fig.1.

B hordein là phân đoạn protein chủ yếu, khác biệt với C hordein về hàm lượng lưu huỳnh của chúng (Kreis and Shewry, 1989). B hordein chiếm 70– 80% của hordein toàn phần và C hordein chiếm 10–20% hordein toàn phần (Davies et al., 1993). A hordein thường không được cho là phân đoạn dự trữ, trong đó D hordein tương đồng với glutenin có trọng lượng phân tử cao. Hordein, cùng với phần còn lại của prolamin ngũ cốc có liên quan, không được biểu hiện trong bản thân phôi hợp tử, không giống như các protein dự trữ khác như napin; chúng được cho là được biểu hiện chỉ trong nội

nhũ chứa tinh bột trong giai đoạn sớm-đến-muộn của quá trình phát triển hạt. Ví dụ về trình tự axit amin của hordein lúa mạch và gen mã hóa chúng được thể hiện trong WO 2009/021285.

Mạch nha hóa

Đồ uống trên cơ sở mạch nha đề xuất bởi sáng chế bao gồm đồ uống có cồn (kể cả đồ uống chưng cất) và đồ uống không có cồn được sinh ra bằng cách sử dụng mạch nha làm một phần hoặc toàn bộ nguyên liệu ban đầu của chúng. Các ví dụ bao gồm bia, happoshu (đồ uống có vị bia có hàm lượng mạch nha thấp), rượu uyt-ki, đồ uống trên cơ sở mạch nha có hàm lượng cồn thấp (ví dụ, đồ uống trên cơ sở mạch nha chứa cồn với hàm lượng dưới 1%), và đồ uống không chứa cồn.

Mạch nha hóa là quá trình ngâm và làm nảy mầm có kiểm soát, tiếp theo là làm khô hạt lúa mạch. Chuỗi các sự kiện này rất quan trọng đối với quá trình tổng hợp nhiều enzym làm biến đổi hạt, quy trình mà chủ yếu khử polyme thành tế bào nội nhũ đã chết và huy động các chất dinh dưỡng của hạt. Trong quá trình làm khô tiếp theo, hương vị và màu sắc được tạo ra do các phản ứng nhuộm nâu hóa học. Mặc dù, việc sử dụng ban đầu của mạch nha là để sản xuất đồ uống, nó còn có thể được sử dụng trong các quy trình công nghiệp khác, ví dụ là nguồn enzym trong ngành công nghiệp sản xuất bánh, hoặc là chất tạo hương vị và tạo màu trong ngành công nghiệp thực phẩm, ví dụ dưới dạng mạch nha hoặc dưới dạng bột mạch nha, hoặc không trực tiếp dưới dạng xi rô mạch nha, v.v..

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm mạch nha. Tốt hơn là phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) cung cấp hạt của cây lúa mạch theo sáng chế,
- (ii) ngâm hạt nêu trên,
- (iii) làm nảy mầm hạt đã được ngâm trong các điều kiện đã định trước và
- (iv) làm khô hạt đã nảy mầm nêu trên.

Ví dụ, mạch nha có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã được mô tả trong Hoseney (Principles of Cereal Science và Technology, Second Edition, 1994: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.). Tuy nhiên, phương pháp thích hợp khác bất kỳ để sản xuất mạch nha cũng có thể được sử dụng bởi sáng chế, như phương pháp để sản xuất mạch nha đặc biệt, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp rang mạch nha. Một ví dụ không làm

giới hạn phạm vi của sáng chế được mô tả trong Ví dụ 6.

Mạch nha có thể được điều chế bằng cách sử dụng chỉ hạt được tạo ra từ cây lúa mạch theo sáng chế hoặc trong hỗn hợp bao gồm các loại hạt khác.

Mạch nha chủ yếu được sử dụng để nấu bia, nhưng còn được sử dụng để sản xuất rượu chưng cất. Quá trình nấu bia bao gồm các bước sản xuất hèm rượu, bước lên men chính và phụ và bước hậu xử lý. Đầu tiên, mạch nha được xay, khuấy vào nước và gia nhiệt. Trong bước “ủ rượu” này, enzym được hoạt hóa trong quá trình mạch nha hóa làm thoái biến tinh bột của nhân phôi thành đường có thể lên men. Hèm rượu tạo ra được làm trong, nấm men được thêm vào, hỗn hợp này được lên men và bước hậu xử lý được thực hiện.

Theo phương án khác, chế phẩm hèm rượu có thể được điều chế từ mạch nha. Hèm rượu này có thể là hèm rượu thứ nhất và/hoặc thứ hai và/hoặc hèm rượu tiếp nữa. Nói chung, chế phẩm hèm rượu sẽ chứa amin nitơ với hàm lượng cao và cacbohydrat có thể lên men được, chủ yếu là maltoza. Thông thường, hèm rượu được điều chế bằng cách ủ mạch nha với nước, nghĩa là bằng cách ủ rượu. Trong quá trình ủ rượu, chế phẩm mạch nha/nước có thể được thêm chế phẩm giàu cacbohydrat bổ sung, ví dụ các chất phụ lúa mạch, ngô hoặc gạo. Các chất phụ ngũ cốc chưa được mạch nha hóa thường chứa enzym không hoạt tính, và do đó dựa vào mạch nha hoặc enzym ngoại sinh để tạo ra enzym cần thiết để chuyển hóa đường.

Nói chung, bước thứ nhất trong quy trình sản xuất hèm rượu là xay mạch nha để nước có thể thâm nhập vào các hạt nhỏ của hạt trong pha ủ rượu, mà về cơ bản là sự mở rộng của quá trình mạch nha hóa bằng sự khử polyme của các cơ chất dưới tác dụng của enzym. Trong quá trình ủ rượu, mạch nha đã xay được ủ với phân đoạn lỏng như nước. Nhiệt độ hoặc được giữ không đổi (ủ rượu đẳng nhiệt) hoặc được tăng dần. Trong trường hợp khác, chất tan được tạo ra trong quá trình mạch nha hóa và ủ rượu được chiết vào phân đoạn lỏng nêu trên trước khi được tách bằng cách lọc vào hèm rượu và các hạt nhỏ rắn còn lại là hạt đã được sử dụng. Hèm rượu này cũng có thể là hèm rượu thứ nhất. Sau khi lọc, thu được hèm rượu thứ hai. Các hèm rượu khác nữa có thể được điều chế bằng cách lặp lại quy trình nêu trên. Một ví dụ không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của sáng chế về phương pháp thích hợp để điều chế hèm rượu được mô tả trong Hoseneý (*nêu trên*).

Chế phẩm hèm rượu còn có thể được điều chế bằng cách ủ cây lúa mạch theo sáng

chế hoặc các bộ phận của nó với một hoặc nhiều enzym thích hợp, như chế phẩm enzym hoặc chế phẩm hỗn hợp enzym, ví dụ Ultraflo hoặc Cereflo (Novozymes). Chế phẩm hèm rượu cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng hỗn hợp bao gồm mạch nha và cây lúa mạch các bộ phận của nó chưa được mạch nha hóa, tùy ý bổ sung một hoặc nhiều enzym thích hợp trong quá trình điều chế này. Ngoài ra, enzym prolyl-endopeptidaza chỉ phá hủy đặc hiệu liên kết amin độc hại liên quan đến bệnh tiêu chảy mỡ có thể được thêm vào trong quá trình lên men hèm rượu để làm giảm độc tính của hordein còn lại (De Angelis et al., 2007; Marti et al., 2005; Stepniak et al., 2006).

Xử lý hạt

Hạt lúa mạch theo sáng chế có thể được xử lý để tạo ra thành phần thực phẩm, thành phần đồ uống, thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc sản phẩm không phải là thực phẩm bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, sản phẩm là bột hạt nguyên cám (bột hạt nguyên cám chưa được xay siêu mịn, như bột hạt nguyên cám chưa được xay siêu mịn; bột hạt nguyên cám, hoặc bột được sản xuất từ khoảng 100% hạt). Bột hạt nguyên cám bao gồm thành phần bột đã tinh chế (bột đã tinh chế) và phân đoạn thô (phân đoạn thô chưa được xay siêu mịn).

Bột đã được tinh chế có thể là bột được điều chế, ví dụ, bằng cách xay và sàng lúa mạch sạch. Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA: *Food and Drug Administration*) đòi hỏi bột đáp ứng một số tiêu chuẩn về kích thước hạt để được cho là thuộc loại bột lúa mạch đã được tinh chế. Kích thước hạt của bột đã được tinh chế được mô tả là bột trong đó không dưới 98% đi qua tấm vải có độ mở không lớn hơn độ mở của lưới thép cỡ “212 micromet (U.S. Wire 70)”.

Phân đoạn thô bao gồm ít nhất một trong số: cám và phôi. Ví dụ, phôi là phôi thực vật được tìm thấy trong nhân phôi lúa mạch. Phôi chứa lipid, chất xơ, vitamin, protein, chất khoáng và các chất dinh dưỡng thực vật, như flavonoid. Cám bao gồm một số lớp tế bào và chứa lipid, chất xơ, vitamin, protein, chất khoáng và các chất dinh dưỡng thực vật, như flavonoid, với lượng đáng kể. Hơn nữa, phân đoạn thô có thể bao gồm lớp aleuron còn chứa lipid, chất xơ, vitamin, protein, chất khoáng và các chất dinh dưỡng thực vật, như flavonoid. Lớp aleuron, trong lúc, về mặt kỹ thuật, được cho là một phần của nội nhũ, có nhiều đặc tính tương tự như đặc tính của cám và do đó thường được lấy ra cùng với cám và phôi trong quá trình xay. Lớp aleuron chứa protein, vitamin và các

chất dinh dưỡng thực vật, như axit ferulic.

Hơn nữa, phân đoạn thô có thể được trộn với thành phần bột đã tinh chế. Tốt hơn, nếu phân đoạn thô được trộn đồng nhất với thành phần bột đã tinh chế. Việc trộn đồng nhất phân đoạn thô và thành phần bột đã tinh chế có thể giúp làm giảm sự phân tầng của các hạt nhỏ bởi kích thước trong quá trình vận chuyển. Phân đoạn thô có thể được trộn với thành phần bột đã tinh chế để tạo ra bột hạt nguyên cám, do đó tạo ra bột hạt nguyên cám có giá trị dinh dưỡng, hàm lượng chất xơ, và khả năng chống oxy hóa cao khi so sánh với bột đã được tinh chế. Ví dụ, phân đoạn thô hoặc bột hạt nguyên cám có thể được sử dụng ở các lượng khác nhau để thay thế bột hạt đã được tinh chế hoặc nguyên cám trong bánh nướng, đồ ăn nhẹ, và sản phẩm thực phẩm. Bột hạt nguyên cám theo sáng chế (nghĩa là bột hạt nguyên cám chưa được xay siêu mịn) cũng có thể được bán trực tiếp trên thị trường cho người tiêu dùng để sử dụng trong các sản phẩm bánh nướng tại nhà của họ. Theo phương án làm ví dụ, profil tạo hạt của bột hạt nguyên cám là profil sao cho 98% trọng lượng hạt của bột hạt nguyên cám nhỏ hơn 212 micromet.

Theo các phương án khác, enzym được tìm thấy trong cám và phôi của bột hạt nguyên cám và/hoặc phân đoạn thô được bất hoạt để làm ổn định bột hạt nguyên cám và/hoặc phân đoạn thô. Sáng chế dự định rằng thuật ngữ bị bất hoạt cũng có cùng nghĩa như bị ức chế, bị làm biến chất, hoặc các nghĩa tương tự. Làm ổn định là quá trình sử dụng hơi, nhiệt, tia xạ hoặc các phương pháp xử lý khác để làm bất hoạt enzym có mặt trong lớp cám và phôi. Các enzym có mặt tự nhiên trong cám và phôi sẽ xúc tác các phản ứng biến đổi của các hợp chất trong bột, ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính nấu nướng của bột và thời hạn sử dụng. Enzym bất hoạt không xúc tác các phản ứng biến đổi của các hợp chất có mặt trong bột, do đó, bột đã được làm ổn định vẫn giữ lại được các đặc tính nấu nướng của nó và có thời hạn sử dụng dài hơn. Ví dụ, để thực hiện sáng chế, có thể áp dụng kỹ thuật xay hai dòng để xay phân đoạn thô. Khi phân đoạn thô được tách ra và làm ổn định, sau đó phân đoạn thô được xay nhờ máy xay, tốt hơn, là máy cán rền, để tạo ra phân đoạn thô sự phân bố kích thước hạt nhỏ hơn hoặc bằng 500 micromet. Theo phương án làm ví dụ, tốc độ đầu máy cán rền thường hoạt động trong khoảng từ 115m/giây đến 144m/giây, tốc độ đầu máy cao sẽ tạo ra nhiệt. Nhiệt tạo ra trong quá trình và dòng không khí làm giảm lượng tải vi khuẩn của phân đoạn thô. Theo các phương án khác, trước khi xay trong máy cán rền, phân đoạn thô có thể có số đếm trên đĩa háo khí trung bình bằng 95000 đơn vị tạo khuẩn lạc/gam (cfu

(colony forming unit)/g) và số đếm vi khuẩn dạng coli trung bình bằng 1200cfu/g. Sau khi đi qua máy cán rền, phân đoạn thô có thể có số đếm trên đĩa háo khí trung bình bằng 10000cfu/g và số đếm vi khuẩn dạng coli trung bình bằng 900cfu/g. Do đó, lượng tải vi khuẩn có thể được giảm ở mức nhận thấy được trong phân đoạn thô theo sáng chế. Sau khi rây, phân đoạn thô đã xay bất kỳ có kích thước hạt lớn hơn 500 micromet có thể được cho quay trở lại quy trình để xay tiếp.

Theo các phương án khác, bột hạt nguyên cám hoặc phân đoạn thô có thể là thành phần của sản phẩm thực phẩm. Ví dụ, sản phẩm thực phẩm có thể là bánh mì vòng, bánh quy, bánh mì, bánh mì tròn, bánh sừng bò, bánh hấp, bánh nướng xốp kiểu Anh, bánh nướng xốp, bánh mì pita, bánh mì nhanh, sản phẩm bột nhào được làm lạnh/làm đông lạnh, bột nhào, đậu hằm, bánh bột ngô, tương ớt, bánh taco, bánh tamale, bánh tortilla, bánh pot pie, ngũ cốc ăn liền, bột ăn liền, hỗn hợp nhồi, bột có thể vi sóng được, bánh brownie, bánh ngọt, bánh phomat, bánh ngọt cafe, bánh quy, món tráng miệng, bánh nướng, bánh cuộn, kẹo, vỏ bánh nướng, nhân bánh nướng, thực phẩm dành cho trẻ em, hỗn hợp bột để nướng bánh, hỗn hợp bánh nướng, bánh mì, hỗn hợp nước xốt, chất độn dùng cho thịt, chất thay thế thịt, hỗn hợp gia vị, hỗn hợp súp, nước xốt, bột đảo bơ, nước xốt salat, súp, kem chua, mì sợi, mì ống, mì ramen, mì chow mein, mì mein, hạt và siro dành cho kem, kem que, vỏ ốc quế, bánh kẹp kem, bánh quy giòn, bánh mì nướng ăn với súp, bánh donut, trứng cuộn, bim bim, bánh hoa quả và hạt, đồ ăn nhẹ có thể vi sóng được, bánh dinh dưỡng, bánh bột rán, sản phẩm bánh mì nướng sơ, bánh quy pretzel, bánh put-ding, sản phẩm trên cơ sở granola, khoai tây chiên, đồ ăn nhẹ, hỗn hợp đồ ăn nhẹ, bánh waffle, đế piza, thực phẩm cho động vật hoặc thực phẩm cho thú nuôi.

Theo các phương án khác, bột hạt nguyên cám hoặc phân đoạn thô có thể là thành phần của sản phẩm bổ sung dinh dưỡng. Ví dụ, sản phẩm bổ sung dinh dưỡng có thể là sản phẩm được thêm vào chế độ ăn chứa một hoặc nhiều thành phần, thường bao gồm: vitamin, chất khoáng, thảo mộc, axit amin, enzym, chất chống oxy hóa, thảo mộc, gia vị, các vi khuẩn có lợi (probiotic), dịch chiết, prebiotic (nguồn thức ăn cho probiotic) và chất xơ. Bột hạt nguyên cám hoặc phân đoạn thô theo sáng chế bao gồm vitamin, chất khoáng, axit amin, enzym, và chất xơ. Ví dụ, phân đoạn thô chứa lượng đậm đặc của chất xơ thô cũng như các chất dinh dưỡng thiết yếu khác, như B-vitamin, selen, crom, mangan, magie, và chất chống oxy hóa, là thiết yếu cho chế độ ăn mạnh khỏe. Ví dụ 22

gam phân đoạn thô theo sáng chế phân phối 33% trong tổng nhu cầu chất xơ hằng ngày được khuyến cáo. Hơn nữa, 14 gam phân đoạn thô theo sáng chế là cần thiết để phân phối 20% trong tổng nhu cầu chất xơ hằng ngày được khuyến cáo. Do đó, phân đoạn thô là nguồn bổ sung tuyệt vời cho nhu cầu chất xơ của mỗi cá nhân. Do đó, theo một phương án, bột hạt nguyên cám hoặc phân đoạn thô có thể là thành phần của chất bổ sung dinh dưỡng. Chất bổ sung dinh dưỡng có thể chứa thành phần dinh dưỡng đã biết bất kỳ sẽ hỗ trợ sức khỏe chung của mỗi cá nhân, các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vitamin, chất khoáng, các thành phần xơ khác, axit béo, chất chống oxy hóa, axit amin, peptit, protein, lutein, riboza, axit béo omega-3, và/hoặc các thành phần dinh dưỡng khác.

Các phương án khác, bột hạt nguyên cám hoặc phân đoạn thô có thể là chất bổ sung xơ hoặc thành phần của nó. Nhiều chất bổ sung xơ hiện đang được sử dụng như vỏ hạt mã đề (psyllium husk), dẫn xuất xenluloza, và gôm gua đã thủy phân có giá trị dinh dưỡng hạn chế so với hàm lượng chất xơ của chúng. Ngoài ra, nhiều chất bổ sung xơ có kết cấu không mong muốn và vị khó chịu.

Chất bổ sung xơ được sản xuất từ bột hạt nguyên cám hoặc phân đoạn thô có thể giúp phân phối chất xơ cũng như protein, và chất chống oxy hóa. Chất bổ sung xơ có thể được phân phối, nhưng không chỉ giới hạn, ở các dạng sau: hỗn hợp đồ uống liền, đồ uống liền, bánh dinh dưỡng, bánh xốp, bánh quy, bánh quy tròn, thạch, viên nang, kẹo, viên nén nhai được và viên tròn. Một phương án phân phối chất bổ sung xơ ở dạng đồ uống shake hoặc loại mạch nha có hương vị, phương án này có thể là đặc biệt hấp dẫn dưới dạng chất bổ sung xơ cho trẻ em.

Theo phương án khác, quá trình xay có thể được sử dụng để tạo ra bột đa hạt, bột đa lúa mạch, hoặc phân đoạn thô đa hạt. Ví dụ, cám và phôi từ một loại lúa mạch có thể được xay và phối hợp với nội nhũ đã xay hoặc bột hạt nguyên cám lúa mạch của loại lúa mạch khác. Theo cách khác, cám và phôi của một loại hạt khác có thể được xay và phối hợp với nội nhũ xay hoặc bột hạt nguyên cám của loại hạt khác. Theo phương án khác, cám và phôi từ loại lúa mạch hoặc hạt thứ nhất có thể được phối hợp với cám và phôi từ loại lúa mạch hoặc hạt thứ hai để tạo ra phân đoạn thô đa hạt. Dự định rằng sáng chế bao gồm bước trộn hỗn hợp bất kỳ của một hoặc nhiều loại cám, phôi, nội nhũ, và bột hạt nguyên cám của một hoặc nhiều hạt. Phương pháp đa hạt, đa lúa mạch này có thể được sử dụng để tạo ra bột thông thường và lợi dụng các đặc tính và hàm

lượng dinh dưỡng của nhiều loại hạt hoặc lúa mạch để tạo ra một loại bột.

Bột hạt nguyên cám theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều quy trình xay khác nhau. Một phương án ví dụ bao gồm bước xay hạt trong một dòng duy nhất mà không cần tách nội nhũ, cám, và phôi của hạt thành nhiều dòng riêng rẽ. Hạt sạch và đã phối trộn được chuyển đến máy xay hành trình thứ nhất, như máy nghiền búa, máy nghiền trục lăn, máy nghiền đỉnh gim (pin mill), máy nghiền va đập, máy nghiền đĩa, máy nghiền ma sát, máy cán rền, hoặc các máy tương tự. Theo một phương án, máy xay có thể là máy cán rền. Sau khi xay, hạt được dỡ ra và chuyển vào máy sàng. Máy sàng bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này để sàng hạt đã xay có thể được sử dụng. Vật liệu đi qua lưới của máy sàng là bột hạt nguyên cám theo sáng chế và không cần phải xử lý tiếp. Vật liệu còn lại trên mặt lưới được gọi là phân đoạn thứ hai. Phân đoạn thứ hai có kích thước hạt cần được giảm thêm nữa. Do đó, phân đoạn thứ hai này có thể được chuyển đến máy xay hành trình thứ hai. Sau khi xay, phân đoạn thứ hai có thể được chuyển đến máy sàng thứ hai. Vật liệu đi qua lưới của máy sàng thứ hai là bột hạt nguyên cám theo sáng chế. Vật liệu còn lại trên lưới được gọi là phân đoạn thứ tư và cần được xử lý tiếp để làm giảm kích thước hạt. Phân đoạn thứ tư trên lưới của máy sàng thứ hai được chuyển trở lại hoặc máy xay hành trình thứ nhất hoặc máy xay hành trình thứ hai để xử lý tiếp nhờ chu kỳ hồi tiếp. Theo phương án khác theo sáng chế, quy trình này có thể bao gồm nhiều máy xay hành trình thứ nhất để tạo ra năng suất của hệ cao hơn.

Dự định rằng các sản phẩm bột hạt nguyên cám, phân đoạn thô và/hoặc hạt theo sáng chế có thể được tạo ra bởi quy trình xay đã biết trong lĩnh vực này. Hơn nữa, dự định rằng sản phẩm bột hạt nguyên cám, phân đoạn thô và/hoặc hạt theo sáng chế có thể được biến đổi hoặc tăng cường bằng nhiều quy trình khác như: lên men, ăn liền hóa, ép đùn, bao nang, nướng, quay, hoặc các quy trình tương tự.

Các polynucleotit điều hòa giảm sự sản sinh hordein

Theo một phương án, hạt theo sáng chế, và/hoặc được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, được tạo ra từ cây lúa mạch chuyển gen chứa gen chuyển mã hóa polynucleotit điều hòa giảm sự sản sinh của ít nhất một hordein trong hạt. Ví dụ về các polynucleotit này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, polynucleotit đối nghĩa, polynucleotit có nghĩa, polynucleotit xúc tác, microARN nhân tạo hoặc phân tử ARN sợi kép. Khi có mặt trong hạt, mỗi polynucleotit trong số các polynucleotit này làm

giảm mARN trong hordein chịu trách nhiệm dịch mã.

Polynucleotit đối nghĩa

Thuật ngữ “polynucleotit đối nghĩa” có thể có nghĩa là phân tử ADN hoặc ARN, hoặc phối hợp của chúng, bổ sung cho ít nhất một phần của phân tử mARN cụ thể mã hóa hordein và có thể gây cản trở sự kiện hậu phiên mã như dịch mã mARN. Việc sử dụng các kỹ thuật đối nghĩa là đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem G. Hartmann and S. Endres, *Manual of Antisense Methodology*, Kluwer (1999)). Việc sử dụng các kỹ thuật đối nghĩa ở thực vật đã được nêu bởi Bourque (1995) và Senior (1998). Senior (1998) cho rằng hiện giờ các phương pháp đối nghĩa là các kỹ thuật rất tốt để thao tác biểu hiện gen.

Polynucleotit đối nghĩa trong cây lúa mạch theo sáng chế sẽ lai với polynucleotit đích trong các điều kiện sinh lý. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “polynucleotit đối nghĩa lai hóa trong các điều kiện sinh lý” có nghĩa là polynucleotit (sợi đơn đầy đủ hoặc một phần) ít nhất có khả năng tạo ra polynucleotit sợi kép với mARN mã hóa protein, như hordein lúa mạch trong các điều kiện bình thường trong tế bào lúa mạch.

Phân tử đối nghĩa có thể chứa các trình tự tương ứng với gen cấu trúc hoặc các trình tự có tác dụng điều khiển sự biểu hiện gen hoặc sự kiện tách intron. Ví dụ, trình tự đối nghĩa có thể tương ứng với vùng mã hóa có đích của gen theo sáng chế, hoặc vùng 5'-không được dịch mã (UTR: untranslated region) hoặc 3'-UTR hoặc phối hợp của chúng. Nó có thể bổ sung một phần cho các trình tự intron, mà có thể được tách intron trong hoặc sau khi phiên mã, tốt hơn, là chỉ bổ sung cho trình tự exon của gen đích. Nói chung, về sự phân tán lớn hơn của các UTR, việc tạo đích các vùng này tạo ra tính đặc hiệu lớn hơn của sự ức chế gen.

Chiều dài của trình tự đối nghĩa nên ít nhất là 19 nucleotit kế tiếp, tốt hơn, là ít nhất 50 nucleotit, và tốt hơn nữa là ít nhất 100, 200, 500 hoặc 1000 nucleotit. Sự bổ sung trình tự có chiều dài đầy đủ cho toàn bộ sản phẩm phiên mã gen có thể được sử dụng. Tốt hơn, nếu chiều dài này là 100-2000 nucleotit.

Độ đồng nhất trình tự đối nghĩa với sản phẩm phiên mã đích nên ít nhất là 90% và tốt hơn nữa là 95-100%. Hiển nhiên là, phân tử ARN đối nghĩa có thể chứa các trình tự không liên quan mà có thể có chức năng làm ổn định phân tử.

Polynucleotit xúc tác

Thuật ngữ polynucleotit/axit nucleic xúc tác được dùng để chỉ phân tử ADN hoặc

phân tử chứa ADN (còn được biết đến trong lĩnh vực này là “deoxyribozym”) hoặc phân tử ARN hoặc phân tử chứa ARN (còn được gọi là “ribozym”) nhận biết đặc hiệu chất khác biệt và xúc tác sự biến đổi hóa học của chất này. Các bazơ axit nucleic trong axit nucleic xúc tác có thể là các bazơ A, C, G, T (và U đối với ARN).

Thông thường, axit nucleic xúc tác chứa trình tự đối nghĩa để nhận biết đặc hiệu axit nucleic đích, và hoạt tính enzym tách axit nucleic (ở đây, còn được gọi là “vùng xúc tác”). Đặc biệt, các loại ribozym có thể được sử dụng theo sáng chế là ribozym đầu búa (Haseloff and Gerlach, 1988, Perriman et al., 1992) và ribozym cặp tóc (Shippy et al., 1999).

Ribozym trong cây lúa mạch theo sáng chế và ADN mã hóa ribozym có thể được tổng hợp hóa học bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ribozym còn có thể được điều chế từ phân tử ADN (mà khi phiên mã, tạo ra phân tử ARN) liên kết điều khiển với gen khởi đầu ARN polymeraza, ví dụ, gen khởi đầu đối với T7 ARN polymeraza hoặc SP6 ARN polymeraza. Khi vector cũng chứa gen khởi đầu ARN polymeraza liên kết điều khiển với phân tử ADN, thì ribozym có thể được tạo ra *in vitro* khi ủ với ARN polymeraza và nucleotit. Theo phương án riêng rẽ, ADN có thể được chèn vào caset biểu hiện hoặc caset phiên mã. Sau khi tổng hợp, phân tử ARN có thể được biến đổi bằng cách buộc vào phân tử ADN có khả năng làm ổn định ribozym và làm cho nó kháng với ARNaza.

Như bằng polynucleotit đối nghĩa được mô tả ở đây, polynucleotit xúc tác cũng có khả năng lai hóa phân tử axit nucleic đích (ví dụ mARN mã hóa hordein lúa mạch) trong “các điều kiện sinh lý” nghĩa là các điều kiện trong tế bào lúa mạch.

Can thiệp ARN

Can thiệp ARN (RNAi: RNA interference) là đặc biệt hữu hiệu để ức chế đặc hiệu sự sản sinh một protein cụ thể. Mặc dù không muốn bị giới hạn bởi lý thuyết, Waterhouse et al. (1998) đã đề xuất một mô hình cho cơ chế mà bằng cách đó dsARN (ARN sợi kép) có thể được sử dụng để làm giảm sự sản sinh protein. Công nghệ này dựa vào sự có mặt của phân tử dsARN chứa trình tự mà gần như giống với mARN của gen quan tâm hoặc một phần của nó, trong trường hợp này mARN mã hóa polypeptit theo sáng chế. Thích hợp là, dsARN có thể được tạo ra từ gen khởi đầu đơn trong vector tái tổ hợp hoặc tế bào chủ, tại đó các trình tự có nghĩa và đối nghĩa được chặn bằng trình tự không liên quan cho phép các trình tự có nghĩa và đối nghĩa lai hóa để tạo ra

phân tử dsARN có trình tự không liên quan tạo ra cấu trúc vòng. Dạng và sự sản sinh phân tử dsARN thích hợp đối với sáng chế thuộc khả năng của chuyên gia trong lĩnh vực này, cụ thể khi xem xét Waterhouse et al. (1998), Smith et al. (2000), WO 99/32619, WO 99/53050, WO 99/49029, và WO 01/34815.

Theo một ví dụ, ADN được đưa vào sao cho hướng vào sự tổng hợp ít nhất một phần sản phẩm ARN sợi kép (duplex) có độ tương đồng với gen đích được bất hoạt. Do đó, ADN chứa cả trình tự có nghĩa và trình tự đối nghĩa mà, khi được phiên mã vào ARN, có thể lai hóa để tạo ra vùng ARN sợi kép. Theo phương án được ưu tiên, trình tự có nghĩa và đối nghĩa được tách biệt nhau bởi vùng đệm chứa intron mà, khi được phiên mã vào ARN, sẽ được tách ra. Kiểu sắp xếp này được thể hiện để tạo ra hiệu suất làm bất hoạt gen cao hơn. Vùng sợi kép có thể chứa một hoặc hai phân tử ARN, được phiên mã từ hoặc một hoặc hai vùng ADN. Sự có mặt của phân tử sợi kép được cho là kích hoạt đáp ứng từ hệ thực vật nội sinh phá hủy cả ARN sợi kép và cả sản phẩm phiên mã ARN tương đồng từ gen thực vật đích, làm giảm hoặc hạn chế một cách có hiệu quả hoạt tính của gen đích.

Chiều dài của trình tự có nghĩa và đối nghĩa lai hóa, mỗi trình tự, nên ít nhất chứa 19 nucleotit kế tiếp, tốt hơn là ít nhất 30 hoặc 50 nucleotit, và tốt hơn nữa là ít nhất 100, 200, 500 hoặc 1000 nucleotit. Trình tự có chiều dài đầy đủ so với toàn bộ sản phẩm phiên mã gen có thể được sử dụng. Tốt nhất, nếu chiều dài này là 100-2000 nucleotit. Độ đồng nhất của trình tự có nghĩa và đối nghĩa với sản phẩm phiên mã đã được tạo đích nên ít nhất là 85%, tốt hơn là ít nhất 90% và tốt hơn nữa là 95-100%. Hiển nhiên là, phân tử ARN có thể chứa các trình tự không liên quan mà có thể có chức năng làm ổn định phân tử. Phân tử ARN có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu ARN polymeraza II hoặc ARN polymeraza III. Ví dụ về gen khởi đầu ARN polymeraza III bao gồm gen khởi đầu tARN hoặc snARN.

Phân tử ARN can thiệp nhỏ (siRNA: small interfering RNA) chứa trình tự nucleotit giống khoảng 19-21 nucleotit kế tiếp của mARN đích. Tốt hơn, là trình tự mARN đích bắt đầu bằng dinucleotit AA, chứa hàm lượng GC bằng khoảng 30-70% (tốt hơn, là 30-60%, tốt hơn nữa là 40-60% và tốt hơn nữa là khoảng 45%-55%), và không có tỷ lệ phần trăm đồng nhất cao với trình tự nucleotit bất kỳ khác với đích của hệ gen của cây lúa mạch trong đó nó được đưa vào, ví dụ, như được xác định bằng các nghiên cứu BLAST chuẩn.

MicroARN

Sự điều hòa microARN là một ngành được chuyên môn hóa rõ ràng của con đường làm bất hoạt ARN phát triển theo hướng điều hòa gen, phân hướng từ iARN/PTGS thông thường. MicroARN là nhóm đặc biệt của ARN nhỏ được mã hóa trong các yếu tố kiểu gen được thiết lập trong đoạn lặp đảo ngược đặc trưng. Khi được phiên mã, gen microARN tạo ra tiền ARN thân-vòng mà từ đó microARN đã được xử lý tiếp. Thông thường, microARN có chiều dài khoảng 21 nucleotit. miRNA giải phóng được đưa vào phức chất kiểu RISC chứa tiểu quần thể cụ thể của protein Argonaute tác dụng lên sự kìm hãm gen đặc hiệu trình tự (ví dụ, xem Millar and Waterhouse, 2005; Pasquinelli et al., 2005; Almeida và Allshire, 2005).

Đồng ức chế

Phương pháp sinh học phân tử khác mà có thể được sử dụng là phương pháp đồng ức chế. Cơ chế của phương pháp đồng ức chế vẫn chưa được hiểu rõ nhưng nó được cho là liên quan đến quá trình làm bất hoạt gen sau phiên mã (PTGS: post-transcriptional gene silencing) và về mặt này có thể rất giống với nhiều ví dụ về sự ức chế đối nghĩa. Nó liên quan đến việc đưa bản sao gen bổ sung hoặc đoạn của nó vào thực vật theo hướng có nghĩa đối với gen khởi đầu để biểu hiện nó. Kích thước của đoạn có nghĩa, sự tương ứng của nó với các vùng gen đích, và độ đồng nhất trình tự của nó với gen đích là như đối với trình tự đối nghĩa được mô tả trên đây. Trong một số trường hợp, bản sao bổ sung của trình tự gen gây trở ngại cho sự biểu hiện của gen thực vật đích. Về việc thực hiện phương pháp đồng ức chế, xem WO 97/20936 và EP 0465572.

Cấu trúc axit nucleic

Cấu trúc axit nucleic có thể được sử dụng để tạo ra cây chuyển gen có thể dễ dàng được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật chuẩn.

Khi chèn vùng mã hóa mARN, cấu trúc này có thể chứa các trình tự intron. Các trình tự intron này có thể hỗ trợ sự biểu hiện của gen chuyển trong thực vật. Thuật ngữ “intron” được sử dụng theo nghĩa thông thường của nó, nghĩa là đoạn gen được phiên mã nhưng không mã hóa protein và được tách ra khỏi ARN trước khi dịch mã. Intron có thể được sát nhập vào 5'-UTR hoặc vùng mã hóa nếu gen chuyển mã hóa sản phẩm được dịch mã, hoặc vị trí bất kỳ trong vùng phiên mã nếu gen chuyển không mã hóa sản phẩm được dịch mã. Tuy nhiên, theo phương án được ưu tiên, vùng mã hóa

polypeptit bất kỳ được tạo ra dưới dạng khung đọc mở duy nhất. Chuyên gia trong lĩnh vực này nhận ra là các khung đọc mở này có thể nhận được bằng cách phiên mã ngược mARN mã hóa polypeptit.

Để đảm bảo biểu hiện thích hợp của gen mã hóa an mARN đang quan tâm, cấu trúc axit nucleic thường chứa một hoặc nhiều yếu tố điều hòa như gen khởi đầu, gen tăng cường, cũng như trình tự kết thúc phiên mã hoặc trình tự polyadenyl hóa. Các yếu tố này là đã biết trong lĩnh vực này.

Vùng khởi đầu phiên mã chứa yếu tố điều hòa có thể tạo ra để biểu hiện điều hòa hoặc biểu hiện cấu trúc trong cây. Tốt hơn, nếu sự biểu hiện ít nhất xảy ra trong tế bào của hạt.

Số lượng gen khởi đầu cơ định có hoạt tính trong tế bào thực vật đã được mô tả. Gen khởi đầu thích hợp để biểu hiện cơ định ở thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, gen khởi đầu 35S của virus khảm của cải hoa lơ (CaMV: cauliflower mosaic virus), gen khởi đầu 35S của virus khảm của cây huyền sâm (FMV: Figwort mosaic virus), gen khởi đầu của virus dạng trục khuẩn của cây mía, gen khởi đầu của virus bệnh đốm vàng của chi thài lài, gen khởi đầu cảm ứng được ánh sáng từ cấu trúc siêu phân tử nhỏ của ribuloza-1,5-bis-phosphat carboxylaza, gen khởi đầu triosephosphat isomerase của cây lúa, gen khởi đầu adenin phosphoribosyltransferaza của *Arabidopsis*, gen khởi đầu của gen actin 1 của cây lúa, gen khởi đầu mannopin synthaza và octopin synthaza, gen khởi đầu Adh, gen khởi đầu sucroza synthaza, gen khởi đầu của phức hợp gen R, và gen khởi đầu của gen protein gắn kết chlorophyll α/β . Các gen khởi đầu này được sử dụng để tạo ra vector ADN mà được biểu hiện ở thực vật; ví dụ, xem WO 84/02913. Tất cả các gen khởi đầu này đều được sử dụng để tạo ra các dạng khác nhau của vector AND tái tổ hợp có thể được biểu hiện ở thực vật.

Gen khởi đầu có thể được biến đổi bằng các yếu tố như nhiệt độ, ánh sáng hoặc áp lực. Thông thường, yếu tố điều hòa sẽ tạo ra đầu 5' của trình tự gen cần được biểu hiện. Cấu trúc này cũng có thể chứa các yếu tố khác có tác dụng tăng cường phiên mã như các vùng polyadenyl hóa nos 3' hoặc ocs 3' hoặc gen kết thúc phiên mã.

Trình tự dẫn đầu 5' không được dịch mã có thể được tạo ra từ gen khởi đầu được chọn để biểu hiện trình tự gen dị tương đồng, và có thể được biến đổi một cách riêng biệt, nếu cần, để làm tăng sự dịch mã của mARN. Về việc tối ưu hóa sự biểu hiện của gen chuyển, xem Koziel et al. (1996). Các vùng 5' không được dịch mã cũng có thể thu

được từ ARN virus của cây (virus khảm của cây thuốc lá, virus khảm của cây thuốc lá, virus khảm của cây ngô lùn, virus khảm Alfalfa, trong số các virus khác) từ gen của sinh vật có nhân điển hình thích hợp, gen của thực vật (gen dẫn đầu protein gắn kết clophyll a/b của cây lúa mì và cây ngô), hoặc từ trình tự gen tổng hợp. Sáng chế không bị giới hạn ở việc sử dụng các cấu trúc trong đó vùng không được dịch mã được tạo ra từ trình tự 5' không được dịch mã đi kèm trình tự gen khởi đầu. Trình tự dẫn đầu còn có thể được tạo ra từ gen khởi đầu hoặc trình tự mã hóa không liên quan. Các trình tự dẫn có thể được sử dụng trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm trình tự dẫn đầu Hsp70 ngô (US 5,362,865 và US 5,859,347), và yếu tố TMV omega.

Sự kết thúc phiên mã được đi kèm với trình tự AND 3' không được dịch mã được liên kết điều khiển trong vector thể khảm với polynucleotit đang quan tâm. Vùng 3' không được dịch mã của phân tử ADN tái tổ hợp chứa tín hiệu polyadenyl hóa có chức năng gây ra sự bổ sung adenylat nucleotit vào đầu tận cùng 3' của ARN ở thực vật. Vùng 3' không được dịch mã có thể nhận được từ các gen khác nhau được biểu hiện trong tế bào thực vật. Vùng 3' không được dịch mã của nopal synthase, vùng 3' không được dịch mã từ gen Rubisco của cấu trúc siêu phân tử nhỏ của cây đậu, vùng 3' không được dịch mã từ gen protein dự trữ hạt 7S cây đậu nành hạt thường được sử dụng trong trường hợp này. Các vùng 3' được phiên mã, không được dịch mã chứa tín hiệu polyadenylat của gen plasmid cảm ứng khối u (Ti: tumor-inducing) *Agrobacterium* plasmid cũng là thích hợp.

Thông thường, cấu trúc axit nucleic chứa chỉ thị dùng để chọn lọc. Chỉ thị dùng để chọn lọc hỗ trợ việc nhận biết và sàng lọc thực vật hoặc tế bào đã được biến nạp bằng phân tử axit nucleic ngoại sinh. Chỉ thị dùng để chọn lọc có thể tạo ra sự kháng thuốc kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ cho tế bào lúa mạch, hoặc cho phép sử dụng các chất như manozơ. Tốt hơn, nếu chỉ thị dùng để chọn lọc tạo ra sự kháng hygromycin cho tế bào lúa mạch.

Tốt hơn, nếu cấu trúc axit nucleic được đưa một cách ổn định vào hệ gen của cây. Do đó, axit nucleic chứa các yếu tố thích hợp cho phép phân tử được đưa vào hệ gen, hoặc cấu trúc này được đặt trong một vector thích hợp mà có thể được đưa vào nhiễm sắc thể của tế bào thực vật.

Một phương án theo sáng chế bao gồm việc sử dụng vector tái tổ hợp, trong đó vector này chứa ít nhất một gen chuyển được thể hiện ở đây, được chèn vào vector bất kỳ

có khả năng phân phối phân tử axit nucleic vào tế bào vật chủ. Vector này chứa trình tự axit nucleic dị tương đồng, đó là trình tự axit nucleic không được tìm thấy trong tự nhiên liền kề với phân tử axit nucleic theo sáng chế và tốt hơn là được tạo ra từ các loài không phải là các loài mà từ đó phân tử axit nucleic được tạo ra. Vector có thể là ARN hoặc ADN, hoặc nhân nguyên thủy hoặc nhân điển hình, và thường là virus hoặc plasmid.

Số lượng vector thích hợp để gây nhiễm ổn định tế bào thực vật hoặc để tạo ra thực vật chuyển gen đã được mô tả, ví dụ, trong Pouwels et al., *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, *Các phương pháp để Plant Molecular Biology*, Academic Press, 1989; và Gelvin et al., *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, 1990. Thông thường, Các vector biểu hiện thực vật chứa, ví dụ, một hoặc nhiều gen thực vật đã được tách dòng trong điều kiện kiểm soát phiên mã của các trình tự điều hòa 5' và 3' và chỉ thị dùng để chọn lọc chiếm ưu thế. Các vector biểu hiện thực vật này cũng có thể chứa vùng điều hòa gen khởi đầu (ví dụ, vùng điều hòa kiểm soát sự biểu hiện cảm ứng hoặc cơ định, sự biểu hiện được điều hòa bởi môi trường hoặc sự phát triển, hoặc sự biểu hiện đặc hiệu tế bào hoặc mô), vị trí bắt đầu phiên mã, vị trí gắn kết ribosom, tín hiệu xử lý ARN, vị trí kết thúc phiên mã, và/hoặc tín hiệu polyadenyl hóa.

Cây chuyển gen

Cây lúa mạch chuyển gen, như được xác định trong ngữ cảnh của sáng chế bao gồm cây (cũng như các bộ phận và tế bào của cây nêu trên) và thế hệ con của nó đã được biến đổi di truyền bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp để tạo ra sự sản sinh của ít nhất một polynucleotit và/hoặc polypeptit trong cây mong muốn hoặc trong cơ quan của cây mong muốn. Cây chuyển gen có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này, như các kỹ thuật được mô tả chung trong A. Slater et al., *Plant Biotechnology - The Genetic Manipulation of Plants*, Oxford University Press (2003), và P. Christou and H. Klee, *Handbook of Plant Biotechnology*, John Wiley and Sons (2004).

Theo một phương án được ưu tiên, cây chuyển gen đồng hợp tử về mỗi và mọi gen mà đã được đưa vào (gen chuyển) thế hệ con không phân cắt về kiểu hình mong muốn. Cây chuyển gen cũng có thể dị hợp tử về gen chuyển được đưa vào, ví dụ, như trong thế hệ con F1 đã được phát triển từ hạt lai. Các cây này có thể mang lại các ích lợi

như ưu thế lai, đã biết trong lĩnh vực này.

Bốn phương pháp chung để phân phối trực tiếp gen vào tế bào đã được mô tả: (1) phương pháp hóa học (Graham et al., 1973); (2) phương pháp vật lý như vi tiêm (Capecchi, 1980); điện di (ví dụ, xem WO 87/06614, US 5,472,869, 5,384,253, WO 92/09696 và WO 93/21335); và súng bắn gen (ví dụ, xem US 4,945,050 và US 5,141,131); (3) phương pháp sử dụng vector virus (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis et al., 1988); và (4) phương pháp có cơ chế qua trung gian thụ thể (Curiel et al., 1992; Wagner et al., 1992).

Phương pháp gia tốc mà có thể được sử dụng, ví dụ, bao gồm phương pháp bắn phá bằng vi đạn (microprojectile bombardment) và phương pháp tương tự. Một ví dụ về phương pháp để phân phối các phân tử axit nucleic đang biến nạp đến tế bào cây là phương pháp bắn phá bằng vi đạn. Phương pháp này đã được mô tả bởi Yang et al., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, Oxford Press, Oxford, England (1994). Hạt phi sinh học (vi đạn) có thể được bao bằng axit nucleic và phân phối vào trong tế bào bằng lực đẩy. Hạt lấy làm ví dụ bao gồm hạt chứa tungsten, vàng, platin, và các hạt tương tự. Ngoài việc phương pháp này là một phương pháp hữu hiệu để biến nạp thực vật một lá mầm theo cách có thể tái sản xuất, một ích lợi cụ thể của phương pháp bắn phá bằng vi đạn là không phải phân lập tế bào nguyên sinh, hoặc không cần đến tính cảm biến của của việc tiêm *Agrobacterium*. Một phương án minh họa về phương pháp phân phối ADN vào tế bào *Zea mays* bằng cách gia tốc là hệ phân phối hạt α bằng cách bắn gen, có thể được sử dụng để đẩy hạt được bao bằng ADN qua lưới chắn, như lưới thép không gỉ hoặc lưới Nytex, lên bề mặt lọc được phủ bằng tế bào ngô nuôi cấy trong huyền phù. Hệ phân phối hạt thích hợp để sử dụng theo sáng chế là súng bắn gen PDS-1000/He gia tốc bằng heli do Bio-Rad Laboratories cung cấp.

Để bắn phá, tế bào trong huyền phù có thể được cô trên bộ lọc. Bộ lọc chứa tế bào để được bắn phá được đặt ở khoảng cách thích hợp phía dưới đĩa làm dừng vi đạn. Nếu cần, một hoặc nhiều lưới chắn cũng được đặt giữa súng và tế bào cần được bắn phá.

Theo cách khác, phôi chưa trưởng thành hoặc tế bào đích khác có thể được sắp xếp trên môi trường nuôi cấy rắn. Tế bào cần được bắn phá được đặt ở khoảng cách thích hợp phía dưới đĩa làm dừng vi đạn. Nếu cần, một hoặc nhiều lưới chắn cũng được đặt giữa thiết bị gia tốc và tế bào cần được bắn phá. Nhờ việc sử dụng các kỹ thuật được đưa ra ở đây có thể nhận được tới lớn hơn hoặc bằng 1000 điểm hội tụ của tế bào

biểu hiện tạm thời một chỉ thị. Số tế bào trong điểm hội tụ biểu hiện sản phẩm gen ngoại sinh 48 giờ sau khi bắn phá thường nằm trong khoảng từ một đến mười và trung bình là từ một đến ba.

Trong quá trình biến nạp do bắn phá, có thể tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy trước khi bắn phá và các thông số bắn phá để tạo ra số lượng lớn nhất các thể biến nạp ổn định. Cả thông số vật lý lẫn thông số sinh học đối với quá trình bắn phá đều quan trọng trong công nghệ này. Các yếu tố vật lý là các yếu tố liên quan đến việc điều khiển sự kết tủa ADN/vi đạn hoặc các yếu tố ảnh hưởng đến sự bay và vận tốc của đại hoặc vi đạn. Các yếu tố sinh học bao gồm tất cả các bước liên quan trong việc điều khiển tế bào trước và ngay sau khi bắn phá, việc điều chỉnh sự thẩm thấu của tế bào đích để giúp giảm thiểu tổn thương đi kèm với việc bắn phá, và còn cả bản chất của ADN đang biến nạp, như ADN mạch thẳng hoặc plasmit siêu xoắn nguyên vẹn. Tin rằng các thao tác trước khi bắn phá là đặc biệt quan trọng để biến nạp thành công phôi chưa trưởng thành.

Theo phương án khác nữa, lập thể có thể được biến nạp ổn định. Phương pháp được bộc lộ về quá trình biến nạp lập thể ở cây cao hơn bao gồm hệ phân phối ADN bằng súng bắn hạt chứa chỉ thị dùng để chọn lọc và hướng đích ADN tới hệ gen lập thể nhờ sự tái tổ hợp tương đồng (U.S. 5, 451,513, U.S. 5,545,818, U.S. 5,877,402, U.S. 5,932,479, và WO 99/05265).

Do đó, dự định rằng có thể hy vọng điều chỉnh nhiều mặt của các thông số bắn phá trong các nghiên cứu trên quy mô nhỏ để tối ưu hóa hoàn toàn các điều kiện. Cụ thể là, có thể hy vọng điều chỉnh các thông số vật lý như khoảng hở, khoảng bay, khoảng cách mô, và áp suất heli. Cũng có thể tối thiểu hóa các yếu tố giảm tổn thương bằng cách biến đổi các điều kiện ảnh hưởng đến trạng thái sinh-lý của tế bào nhận và do đó có thể ảnh hưởng đến sự biến nạp và hiệu quả thâm nhập. Ví dụ, trạng thái thẩm thấu, sự hydrat hóa mô và trạng thái cây chuyển hoặc chu kỳ tế bào của tế bào nhận có thể được điều chỉnh để biến nạp tối ưu. Việc thực hiện các điều chỉnh thông thường khác là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực nhờ bản mô tả này.

Sự cấy chuyển qua trung gian *Agrobacterium* là hệ có ứng dụng rộng rãi để đưa gen vào tế bào thực vật do ADN có thể được đưa vào toàn bộ mô thực vật, bằng cách đó tránh được nhu cầu tái sinh cây nguyên vẹn từ tế bào nguyên sinh. Việc sử dụng vectơ thâm nhập thực vật qua trung gian *Agrobacterium* để đưa ADN vào tế bào cây là

đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, xem US 5,177,010, US 5,104,310, US 5,004,863, US 5,159,135). Hơn nữa, việc thâm nhập của T- ADN là một quy trình tương đối chính xác tạo ra một vài sự sắp xếp lại. Vùng ADN cần được cấy chuyển được xác định bằng trình tự biên, và ADN can thiệp thường được chèn vào hệ gen của thực vật.

Vectơ biến nạp *Agrobacterium* mới có khả năng phiên mã trong *E. coli* cũng như *Agrobacterium*, cho phép thao tác thuận tiện như đã được mô tả (Klee et al., In: Plant ADN Infectious Agents, Hohn và Schell, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 179-203 (1985). Hơn nữa, các tiến bộ kỹ thuật về vectơ đối với sự cấy chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* đã cải thiện sự sắp xếp của gen và điểm giới hạn trong vectơ để tạo điều kiện thuận lợi xây dựng vectơ có khả năng biểu hiện các gen mã hóa polypeptit khác nhau. Các vectơ được mô tả là có các vùng đa liên kết thuận tiện được chặn bởi gen khởi đầu và vị trí polyadenyl hóa để trực tiếp biểu hiện gen mã hóa polypeptit đã được chèn vào và thích hợp cho mục đích theo sáng chế. Ngoài ra, *Agrobacterium* chứa cả gen Ti được bảo vệ và không được bảo vệ có thể được sử dụng để biến nạp. Ở các giống cây này, tại đó sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* có hiệu lực, đó là phương pháp lựa chọn do sự đơn giản và bản chất xác định của việc cấy chuyển gen.

Cây chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp biến nạp *Agrobacterium* thường chứa locus di truyền đơn trên một nhiễm sắc thể. Các cây chuyển gen như vậy có thể được cho là bán hợp tử về gen được thêm vào. Được ưu tiên hơn là cây chuyển gen đồng hợp tử về gen cấu trúc được thêm vào; nghĩa là, cây chuyển gen chứa hai gen được thêm vào, một gen ở cùng locus trên mỗi nhiễm sắc thể của cặp nhiễm sắc thể. Cây chuyển gen đồng hợp tử có thể thu được bằng cách ghép đôi hữu tính (tự phối) cây chuyển gen phân cắt độc lập chứa gen được thêm vào duy nhất, làm nảy mầm một số hạt được tạo ra và phân tích cây tạo ra về gen đang quan tâm.

Còn hiểu được rằng hai cây chuyển gen khác nhau cũng có thể được ghép đôi để tạo ra các cây con chứa hai gen ngoại sinh phân cắt một cách độc lập. Sự tự phối của thể hệ con thích hợp còn có thể tạo ra cây đồng hợp tử về cả hai gen ngoại sinh. Sự lai ngược với cây bố mẹ và sự lai chéo ngoại huyết với cây không chuyển gen cũng được dự tính, vì là sự phát tán thực vật. Các mô tả về các phương pháp nhân giống thường được sử dụng đối với các tính trạng và cây trồng khác nhau có thể được tìm thấy trong Fehr, In: Breeding Method for Cultivar Development, Wilcox J. ed., American Society

of Agronomy, Madison Wis. (1987).

Sự biến nạp của tế bào nguyên sinh của thực vật có thể đạt được bằng cách sử dụng các phương pháp dựa trên sự kết tủa canxi phosphat, xử lý polyetylen glycol, điện di, và phối hợp của các phương pháp xử lý này. Việc sử dụng các hệ này cho các giống cây khác nhau phụ thuộc vào khả năng tái sinh chủng cây cụ thể này từ tế bào nguyên sinh. Phương pháp minh họa cho việc tái sinh ngũ cốc từ tế bào nguyên sinh đã được mô tả trong Fujimura et al., 1985; Toriyama et al., 1986; Abdullah et al., 1986.

Các phương pháp khác để biến nạp tế bào cũng có thể được sử dụng và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp đưa ADN vào thực vật bằng cách cấy chuyển trực tiếp ADN vào phấn hoa, bằng cách tiêm trực tiếp ADN vào cơ quan sinh sản của thực vật, hoặc bằng cách tiêm trực tiếp ADN vào tế bào của phôi chưa trưởng thành tiếp đó hoàn lại độ ẩm cho phôi đã được làm khô.

Việc tái sinh, phát triển, và trồng cây từ thể biến nạp nguyên sinh thực vật đơn hoặc từ nhiều mảnh cây được gây biến nạp khác nhau đã được biết rõ trong lĩnh vực này (Weissbach et al., In: Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, Calif., (1988). Quy trình tái sinh và phát triển đặc trưng bao gồm các bước lựa chọn tế bào thực vật đã biến nạp, nuôi cấy các tế bào đã biệt hóa này qua các giai đoạn phát triển phôi thông thường trong suốt giai đoạn cây non mọc rễ. Phôi và hạt chuyển gen tái sinh tương tự. Các mầm chuyển gen mọc rễ thu được sau đó được trồng trong môi trường phát triển cây thích hợp như đất.

Việc phát triển hoặc tái sinh thực vật chứa gen ngoại lai, gen ngoại sinh cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Tốt hơn là, các cây tái sinh là tự thụ phấn để sinh ra cây chuyển gen đồng hợp tử. Cách khác, phấn hoa thu được từ cây tái sinh được lai chéo với cây trồng từ hạt của các dòng quan trọng trong nông nghiệp. Ngược lại, phấn hoa từ cây của các dòng quan trọng này được sử dụng để thụ phấn cho cây tái sinh. Cây chuyển gen theo sáng chế chứa axit nucleic ngoại sinh mong muốn được nuôi trồng bằng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Phương pháp để biến nạp cây hai lá mầm, chủ yếu bằng cách sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, và thu cây chuyển gen đã được công bố đối với cây bông (U.S. 5,004,863, U.S. 5,159,135, U.S. 5,518,908); cây đậu tương (U.S. 5,569,834, U.S. 5,416,011); chi cải (U.S. 5,463,174); cây lạc (Cheng et al., 1996); và cây đậu (Grant et al., 1995).

Các phương pháp để biến nạp cây ngũ cốc như cây lúa mạch để đưa biến dị di truyền vào cây bằng cách đưa vào axit nucleic ngoại sinh và để tái sinh cây từ tế bào nguyên sinh hoặc phôi thực vật chưa trưởng thành là đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ xem CA 2,092,588, AU 61781/94, AU 667939, US 6,100,447, PCT/US97/10621, US 5,589,617, US 6,541,257, và WO 99/14314. Tốt hơn, là cây lúa mạch chuyển gen được sinh ra bởi quy trình biến nạp qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Vectơ mang cấu trúc axit nucleic mong muốn có thể được đưa vào tế bào lúa mạch dùng để tái sinh của cây hoặc mảnh cây đã được nuôi cấy của mô hoặc hệ thực vật thích hợp như tế bào nguyên sinh.

Tốt hơn, nếu tế bào lúa mạch dùng để tái sinh có nguồn gốc từ mảnh mầm của phôi chưa trưởng thành, phôi trưởng thành, thể chai được tạo ra từ đó, hoặc mô phân sinh.

Để khẳng định sự có mặt của gen chuyển trong tế bào và cây chuyển gen, phương pháp khuếch đại phản ứng chuỗi polymeraza (PCR: polymeraza chain reaction) hoặc phương pháp phân tích thâm tích Southern có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết với các chuyên gia trong lĩnh vực này. Các sản phẩm biểu hiện của gen biến đổi có thể được phát hiện bởi cách bất kỳ trong số hàng loạt cách, phụ thuộc vào bản chất của sản phẩm, và bao gồm phân tích thâm tích Western và thử nghiệm enzym. Một cách đặc biệt hữu hiệu để định lượng sự biểu hiện protein và để phát hiện sự sao chép trong các mô thực vật khác nhau là sử dụng gen thông báo như GUS. Khi đã thu được cây chuyển gen, chúng có thể được trồng để tạo ra mô cây hoặc các bộ phận của cây có kiểu hình mong muốn. Mô cây hoặc bộ phận cây, có thể được thu hoạch, và/hoặc thu lấy hạt. Hạt có thể được sử dụng làm nguồn để trồng thêm cây có mô hoặc bộ phận có đặc điểm mong muốn.

Tạo ra cây đột biến

Có nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để tạo ra lúa mạch có hàm lượng hordein giảm bằng cách gây đột biến gen hordein nội sinh, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, TILLING, nucleaza ngón tay kềm, nucleaza của chất tác động kiểu chất hoạt hóa phiên mã (TALEN: TAL (Transcription activator-like effector nucleaza), và CRSPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

TILLING

Cây theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng quy trình đã biết là

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes). Ở bước đầu tiên, các đột biến đã đưa vào như các biến đổi về cặp bazơ đơn mới được tạo ra trong quần thể thực vật bằng cách xử lý hạt (hoặc phấn hoa) bằng tác nhân gây đột biến hóa học, và sau đó làm cho cây sinh sản, tại đó các đột biến sẽ được kế thừa một cách ổn định. ADN được chiết, và hạt được bảo quản từ tất cả các thành viên của quần thể để tạo ra nguồn dự trữ mà có thể được sử dụng lặp lại trong một khoảng thời gian.

Đối với thử nghiệm TILLING, đoạn mỗi PCR được thiết kế để khuếch đại đặc hiệu gen đích duy nhất đang quan tâm. Tính đặc hiệu là đặc biệt quan trọng nếu đích là thành viên của họ gen hoặc một phần của hệ gen thể đa bội. Tiếp đó, các đoạn mỗi được đánh dấu bằng thuốc nhuộm có thể được sử dụng để khuếch đại sản phẩm PCR từ AND thu thập từ nhiều cá thể. Sản phẩm PCR này được biến tính và ủ lại để cho phép tạo ra các cặp bazơ ghép đôi lệch. Các cặp ghép đôi lệch, hoặc sợi kép dị hợp, thể hiện cả hiện tượng đa hình nucleotit đơn xảy ra trong tự nhiên (SNP: single polymorphism) (nghĩa là, một số cây từ quần thể có khả năng mang cùng một hiện tượng đa hình) và SNP tạo ra (nghĩa là, chỉ một số rất ít cây riêng rẽ có khả năng thể hiện sự đột biến). Sau khi tạo ra sợi kép dị hợp, việc sử dụng endonucleaza, như Cel I, nhận biết và phân cắt ADN ghép đôi lệch là chìa khóa để phát hiện các SNP mới trong quần thể TILLING.

Bằng cách sử dụng phương pháp này, hàng ngàn cây có thể được sàng lọc để xác định cá thể bất kỳ có sự biến đổi bazơ đơn cũng như các đoạn xen hoặc đoạn khuyết nhỏ (1-30bp) trong gen bất kỳ hoặc vùng cụ thể của hệ gen. Các đoạn hệ gen được phân tích có thể có kích thước bất kỳ từ 0,3 đến 1,6kb. Ở mức tập hợp gấp 8 lần, các đoạn 1,4kb (giảm đến đầu cuối của đoạn, tại đó sự phát hiện SNP gặp vấn đề do nhiễu) và 96 đường mỗi thử nghiệm, việc phối hợp này cho phép cả triệu cặp bazơ của ADN hệ gen được sàng lọc mỗi thử nghiệm, làm cho TILLING trở thành một phương pháp có năng suất cao.

TILLING còn được mô tả trong Slade and Knauf (2005) và Henikoff et al., (2004).

Ngoài ra để cho phép phát hiện hiệu quả các đột biến, kỹ thuật TILLING năng suất cao là lý tưởng để phát hiện các hiện tượng đa hình tự nhiên. Do đó, việc kiểm tra ADN đồng nhất chưa được biết đến bằng cách tạo sợi kép dị hợp với trình tự đã biết cho biết số lượng và định vị vị trí đa hình. Cả các biến đổi nucleotit và các đoạn xen và

đoạn khuyết nhỏ được xác định, chứa ít nhất một số đa hình lặp lại được gọi là Ecotilling (Comai et al., 2004).

Mỗi SNP được ghi lại bằng vị trí gần đúng của nó trong một vài nucleotit. Do đó, mỗi kiểu đơn có thể nhận được dựa trên độ linh động của nó. Số liệu trình tự có thể thu được với ứng suất gia tăng tương đối nhỏ bằng cách sử dụng các phần phân ước của cùng một ADN đã được khuếch đại được sử dụng cho thử nghiệm ghép đôi lệch-phân cắt. Đoạn mỗi trình tự trái hoặc phải đối với phản ứng đơn được lựa chọn bởi sự lân cận của nó với hiện tượng đa hình. Phần mềm Sequencher thực hiện nhiều sự sắp thẳng hàng và phát hiện sự biến đổi bazơ, mà trong mỗi trường hợp xác nhận dải gel.

Ecotilling có thể được thực hiện một cách rẻ hơn phương pháp giải trình tự đầy đủ, phương pháp hiện được sử dụng để phát hiện gần hết các SNP. Đã chứa ADN kiểu sinh thái đã được sắp hàng có thể được sàng lọc khác với tập hợp ADN từ cây đã bị đột biến. Do phát hiện là trên gel có sự phân giải cặp bazơ gần và kiểu nền đồng nhất từ đường này sang đường kia, từ dải này sang dải kia mà có kích thước đồng nhất có thể được ghép đôi, việc phát hiện và xác định kiểu gen SNP như vậy theo một bước duy nhất. Theo cách này, việc giải trình tự cuối cùng của SNP là đơn giản và có hiệu quả, được thực hiện nhiều hơn nhờ sự thật là các phần phân ước của cùng các sản phẩm PCR được sử dụng để sàng lọc có thể là đối tượng của việc giải trình tự ADN.

Hiệu chỉnh hệ gen bằng cách sử dụng các nucleaza đặc hiệu vị trí

Việc hiệu chỉnh hệ gen sử dụng các nucleaza thiết kế bao gồm các vùng gắn kết ADN đặc hiệu trình tự dung hợp với modun tách ADN không đặc hiệu. Các nucleaza khả năng này có thể biến đổi di truyền hiệu quả và chính xác bằng cách tạo ra các đoạn gãy sợi kép của ADN được tạo đích kích thích cơ chế sửa chữa ADN tế bào nội sinh của tế bào để sửa chữa đoạn gãy tạo ra. Cơ chế này, ví dụ, bao gồm ghép nối đầu cuối không tương đồng (NHEJ: non-homologous end joining) error-prone và sửa chữa trực tiếp tương đồng.

Với sự có mặt của plasmit cho có nhánh tương đồng được kéo dài, HDR có thể đưa một hoặc nhiều gen chuyển vào để hiệu chỉnh hoặc thay thế gen hiện thời. Khi không có mặt plasmit cho, việc sửa chữa qua trung gian NHEJ tạo ra các đột biến đoạn xen hoặc đoạn khuyết nhỏ của đích mà làm đứt gen.

Các nucleaza thiết kế có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm nucleaza ngón tay kẽm (ZFN: zinc finger nuclease) và nucleaza chất tác động kiểu

chất hoạt hóa phiên mã (TAL: transcription activator-like) (TALEN: transcription activator-like effector nuclease).

Thông thường, các gen mã hóa nucleaza được phân phối vào trong tế bào bằng ADN plasmit, vectơ virus hoặc mARN đã phiên mã *in vitro*. Việc sử dụng các vectơ thông báo thay thế phát huỳnh quang cũng cho phép làm giàu tế bào qua trung gian ZFN và TALEN. Một hệ khác với hệ phân phối gen ZFN, tế bào có thể được tiếp xúc với protein ZFN đã được tinh chế có khả năng vượt qua màng tế bào và gây phá vỡ gen nội sinh.

Các hệ gen phức tạp chứa nhiều bản sao trình tự là giống hoặc rất tương đồng với đích ADN dự tính, có thể làm tắt hoạt tính đích và gây độc tế bào. Chú ý tới điều này, các phương pháp dựa trên cấu trúc (Miller et al., 2007; Szczepek et al., 2007) và sự chọn lọc (Doyon et al., 2011; Guo et al., 2010) có thể được sử dụng để tạo ra các di dime ZFN và TALEN được cải thiện có tính đặc hiệu phân cắt tối ưu hóa và độc tính giảm.

Nucleaza ngón tay kẽm (ZFN) chứa vùng gắn kết ADN và vùng phân cắt ADN, trong đó vùng gắn kết ADN chứa ít nhất một ngón tay kẽm và được liên kết điều khiển với vùng phân cắt ADN. Vùng gắn kết ADN ngón tay kẽm là nằm ở đầu tận cùng N của protein và vùng phân cắt ADN nằm ở đầu tận cùng C của protein này.

ZFN phải có ít nhất một ngón tay kẽm. Theo phương án được ưu tiên, ZFN sẽ có ít nhất ba ngón tay kẽm để có tính đặc hiệu đủ để có thể được sử dụng cho việc tái tổ hợp di truyền đã được tạo đích trong tế bào hoặc cơ thể vật chủ. Thông thường, ZFN có nhiều hơn ba ngón tay kẽm sẽ có tính đặc hiệu tăng dần với mỗi ngón tay kẽm bổ sung.

Vùng ngón tay kẽm có thể được tạo ra từ nhóm hoặc loại ngón tay kẽm bất kỳ. Theo phương án cụ thể, vùng ngón tay kẽm chứa loại ngón tay kẽm Cis_2His_2 mà rất thường được thể hiện, ví dụ, bằng yếu tố phiên mã ngón tay kẽm TFIIIA hoặc Sp1. Theo phương án được ưu tiên, vùng ngón tay kẽm chứa ba loại ngón tay kẽm Cis_2His_2 . Tính đặc hiệu nhận dạng và/hoặc gắn kết ADN của ZFN có thể được thay đổi để thực hiện việc tái tổ hợp di truyền đã được tạo đích ở vị trí đã chọn bất kỳ trong ADN tế bào. Sự sửa đổi này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử và/hoặc tổng hợp hóa học đã biết (ví dụ, xem Bibikova et al., 2002).

Vùng phân cắt ADN ZFN có nguồn gốc từ nhóm bao gồm các vùng phân cắt ADN không đặc hiệu, ví dụ vùng phân cắt ADN của enzym giới hạn Typ II như FokI

(Kim et al., 1996). Endonucleaza hữu hiệu khác có thể bao gồm, ví dụ, HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI, và AlwI.

Một liên kết, nếu có mặt, giữa vùng phân cắt và vùng nhận biết của ZFN chứa trình tự bao gồm các gốc axit amin được chọn sao cho liên kết tạo ra có tính linh hoạt. Hoặc, đối với tính đặc hiệu vị trí đích tối đa, các cấu trúc không liên kết được tạo ra. Cấu trúc không liên kết rất ưa thích gắn kết và sau đó phân cắt giữa các vị trí nhận dạng là phần 6bp. Tuy nhiên, với chiều dài liên kết nằm trong khoảng từ axit amin 0 đến 18, sự phân cắt qua trung gian ZFN xảy ra giữa các vị trí nhận biết là giữa phần 5 và 35bp. Đối với độ dài liên kết đã cho, sẽ có sự giới hạn cho khoảng cách giữa các vị trí nhận biết phù hợp với cả sự liên kết và dime hóa. (Bibikova et al., 2001). Theo phương án được ưu tiên, không có liên kết giữa vùng phân cắt và vùng nhận biết, locus đích chứa hai chín vị trí nhận biết nucleotit theo hướng đảo ngược với vị trí khác, tách biệt bởi đoạn đệm sáu nucleotit.

Theo phương án được ưu tiên, để tạo đích tái tổ hợp hoặc đột biến di truyền theo sáng chế, hai trình tự nhận biết ADN ngón tay kềm 9bp phải được xác định trong ADN chủ. Các vị trí nhận biết này sẽ ở hướng ngược với một vị trí khác và được tách biệt bởi khoảng của ADN 6bp. Sau đó, ZFN được tạo ra bằng cách thiết kế và tạo ra các tổ hợp ngón tay kềm gắn kết đặc hiệu với ADN ở locus đích, và sau đó liên kết các ngón tay kềm với vùng phân cắt ADN.

Hoạt tính ZFN có thể được cải thiện nhờ việc sử dụng các điều kiện nuôi cấy hạ nhiệt ngắn hạn để tăng mức biểu hiện nucleaza (Doyon et al., 2010) và đồng cung cấp các nucleaza đặc hiệu vị trí với xử lý đầu tận cùng ADN (Certo et al., 2012). Tính đặc hiệu của việc hiệu chỉnh hệ gen qua trung gian ZFN có thể được cải thiện bằng cách sử dụng nickaza ngón tay kềm (ZFNickase) kích thích HDR mà không hoạt hóa con đường sửa chữa NHE-J error-prone (Kim et al., 2012; Wang et al., 2012; Ramirez et al., 2012; McConnell Smith et al., 2009).

Nucleaza của chất tác động kiểu chất hoạt hóa phiên mã (TAL) (TALEN) chứa vùng gắn kết ADN của chất tác động TAL và vùng endonucleaza.

Chất tác động TAL là protein của vi khuẩn gây bệnh ở thực vật được tiêm bởi tác nhân gây bệnh vào tế bào của thực vật, tại đó chúng di chuyển đến nhân và hoạt động như là yếu tố phiên mã để mở gen thực vật đặc hiệu. Trình tự axit amin chủ yếu của chất tác động TAL giải trình tự nucleotit mà nó liên kết với. Do đó, vị trí đích có

thể được phỏng đoán đối với chất tác động TAL, và chất tác động TAL có thể được thiết kế và tạo ra cho mục đích gắn kết với các trình tự nucleotit cụ thể.

Được dung hợp với trình tự axit nucleic mã hóa chất tác động TAL là các trình tự mã hóa nucleaza hoặc một phần của nucleaza, thường là vùng phân cắt không đặc hiệu từ endonucleaza giới hạn typ II như FokI (Kim et al., 1996). Các endonucleaza hữu hiệu khác, ví dụ, có thể bao gồm HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI, và AlwI. Sự thật là một số endonucleaza (ví dụ, FokI) chỉ có chức năng như dimer có thể được viết hoa khi làm tăng tính đặc hiệu đích của chất tác động TAL. Ví dụ, trong một vài trường hợp, mỗi monome FokI có thể được dung hợp với trình tự của chất tác động TAL nhận biết trình tự đích ADN khác, và chỉ khi hai vị trí nhận biết ở gần nhau sẽ làm cho các monome bất hoạt lại gần với nhau để tạo ra enzym chức năng. Bằng cách gắn kết ADN để hoạt hóa nucleaza, enzym giới hạn có tính đặc hiệu vị trí cao có thể được tạo ra.

TALEN đặc hiệu trình tự có thể nhận biết trình tự cụ thể trong trình tự nucleotit đích đã chọn trước có mặt trong tế bào. Do đó, theo một số phương án, trình tự nucleotit đích có thể được kiểm tra các vị trí nhận biết nucleaza, và nucleaza cụ thể có thể được lựa chọn dựa trên trình tự đích. Theo các trường hợp khác, TALEN có thể được thiết kế để tạo đích trình tự tế bào cụ thể.

Hiệu chỉnh hệ gen bằng cách sử dụng ADN endonucleaza được điều hướng bởi ARN đã được lập trình

Khác biệt với các nucleaza đặc hiệu vị trí được mô tả trên đây, hệ CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats)/Cas tạo ra một phương pháp khác đối với ZFN và TALEN để tạo ra các xen kẽ di truyền đã được tạo đích. Trong vi khuẩn, hệ CRISPR tạo ra tính miễn dịch mắc phải chống lại sự xâm lấn ADN ngoại lai qua việc tách ADN được điều hướng bởi ARN.

Hệ CRISPR dựa vào CRISPR ARN (crRNA) và ARN khảm hoạt hóa phiên mã (tracrRNA: transactivating chimeric RAN) để làm bất hoạt đặc hiệu trình tự của ADN ngoại lai xâm lấn. Ba loại hệ CRISPR/Cas tồn tại: ở hệ typ II, Cas9 có vai trò là ADN endonucleaza điều hướng bởi ARN có tác dụng phân cắt ADN khi nhận biết đích crRNA–tracrRNA. Cặp bazơ tự do CRISPR ARN có tracrRNA để tạo ra cấu trúc hai ARN điều hướng Cas9 endonucleaza tới các vị trí ADN bổ trợ để phân cắt.

Hệ CRISPR có thể di chuyển tới tế bào thực vật bằng cách đồng phân phối các plasmit biểu hiện Cas endonucleaza và các thành phần crRNA cần thiết. Cas

endonucleaza có thể được chuyển thành nickaza để tạo ra việc kiểm soát bổ sung trên cơ chế sửa chữa ADN (Cong et al., 2013).

Các locus CRISPR là nhóm khác biệt của các đoạn lặp trình tự ngắn (SSR: short sequence repeat) rải rác mà được nhận biết đầu tiên trong *E. coli* (Ishino et al., 1987; Nakata et al., 1989). Các SSR rải rác tương tự đã được xác định trong *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena*, and *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al., 1993; Hoe et al., 1999; Masepohl et al., 1996; Mojica et al., 1995).

Các locus CRISPR khác với các SSR khác bởi cấu trúc của các đoạn lặp, mà được gọi là đoạn lặp ở cách nhau khoảng đều ngắn (SRSR: short regularly spaced repeat) (Janssen et al., 2002; Mojica et al., 2000). Các đoạn lặp này là các cấu trúc ngắn xuất hiện trong các cụm, mà luôn luôn được ở cách nhau đều đặn bởi các trình tự xen duy nhất có chiều dài không đổi (Mojica et al., 2000). Mặc dù các trình tự lặp này được bảo toàn cao giữa các chủng, nhưng số đoạn lặp rải rác và trình tự của vùng đệm khác nhau từ chủng này tới chủng khác (van Embden et al., 2000).

Các đặc tính cấu trúc thông thường của locus CRISPR được mô tả trong Jansen et al., (2002) là (i) có mặt của nhiều đoạn lặp trực tiếp ngắn có hoặc không thể hiện sự biến dị trình tự rất nhỏ giữa các locus đã cho; (ii) có mặt của các trình tự đệm không lặp lại giữa các đoạn lặp có kích thước nhỏ; (iii) có mặt của trình tự dẫn đầu thông thường có vài trăm cặp bazơ ở hầu hết các loài chứa nhiều locus CRISPR; (iv) không có mặt khung đọc mở dài trong locus; và (v) có mặt một hoặc nhiều gen *cas*.

Thông thường, CRISPR là các trình tự đối xứng một phần ngắn 24-40bp chứa các đoạn lặp đảo ngược bên trong và ở đầu tận cùng lên đến 11bp. Mặc dù các cấu trúc tách được đã được phát hiện, nói chung, chúng được sắp xếp trong cụm (lên đến 20 hoặc nhiều hơn mỗi hệ gen) bao gồm các đơn vị lặp nằm cách nhau bởi các trình tự xen 20-58bp duy nhất. CRISPR thường tương đồng trong hệ gen đã cho với gần hết trong số chúng là giống nhau. Tuy nhiên, có các ví dụ về tính không đồng nhất, ví dụ, trong Archaea (Mojica et al., 2000).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen *cas*” được dùng để chỉ một hoặc nhiều gen *cas* thường được kết hợp kèm hoặc gần với hoặc trong vùng lân cận của locus CRISPR biên. Họ protein Cas được mô tả toàn diện trong Haft et al. (2005). Số lượng gen *cas* ở một locus CRISPR đã cho có thể thay đổi giữa các loài.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu thực vật

Lúa mạch dòng cv Sloop (kiểu đại) thu được từ Viện lưu trữ ngũ cốc mùa đông Áo (Australian Winter Cereals Collection, Tamworth, Australia). Risø 56 (không biểu hiện B-hordein) và Risø 1508 (không biểu hiện C-hordein và biểu hiện D- và B-hordein giảm) (Doll, 1973; Doll, 1983) nhận được từ Ngân hàng chất mầm nguyên sinh Bắc-Âu (Nordic Germplasm Bank, Alnarp, Sweden). Risø 1508 là thể đột biến do etylenimin gây ra mang đột biến ở gen *lys3a* trên nhiễm sắc thể 5H làm giảm sự tích lũy của C-hordein. Mỗi dòng trong số các dòng này hiện có sẵn trên thị trường. Cây được phát triển trong điều kiện nhà kính ở 25°C vào ban ngày và 20°C vào ban đêm và hạt thu hoạch được kiểm tra để loại trừ sự nhiễm bẩn. Đối với các thí nghiệm mạch nha hóa và nấu bia, cây của các giống cây Sloop, Risø 56 và Risø 1508 được trồng sát cạnh nhau ở trạm thí nghiệm CSIRO Ginninderra Experimental Station, Canberra, trên cánh đồng, và thu hoạch được 10kg hạt của mỗi dòng. Hạt được mạch nha hóa và nấu được các mẻ 20l bia bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn.

Chiết tách prolamin ra khỏi bột

Để chiết tách prolamin (protein tan trong rượu), hạt được xay thành bột nguyên cám bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn. Prolamin trong bột nguyên cám đã được rửa trong nước (10g) được hòa tan trong propan-2-ol (loại HPLC) 55% (thể tích), dithiothreitol (DTT) 2% (trọng lượng/thể tích) bằng cách ủ ở 65°C trong 45 phút, và kết tủa bằng hai thể tích propan-2-ol ở -20°C qua đêm. Prolamin kết tủa được hòa tan trong ure 8M, DTT 1%, trietanolamin-HCl (pH=6) 25mM, và tinh chế bằng phương pháp sắc ký lỏng protein nhanh (FPLC: fast protein liquid chromatography) trên cột Resource RPC 4ml (GE Healthcare, Sydney, NSW, Australia) được rửa giải bằng 30ml gradien tuyến tính (ở tốc độ 2ml/phút) axetonitril từ 3% đến 60% trong axit trifloaxetic (TFA) 1% (thể tích).

Phương pháp điều chế mẫu trợ lọc (FASP: Filter-Aided Sample Preparation)

50µl dịch chiết hordein được chuyển vào bộ lọc PALL Nanosep 10 MWCO. 200µl ure 8M (Sigma) trong Tris 0,1M/HCl (pH=8,5) (UA) được thêm vào và hỗn hợp này được ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 15 phút ở khoảng 20°C. Dòng chảy ra từ ống được bỏ đi. 200µl UA nữa được thêm vào bộ phận lọc và ly tâm lại ở tốc độ

14000 vòng/phút trong 15 phút. 100µl dung dịch IAA (iodoacetamid 0,05M trong UA) được thêm vào và mẫu được khuấy trộn ở tốc độ 600 vòng/phút trong bộ khuấy trộn nhiệt ở 20°C trong 1 phút và sau đó ủ mà không cần trộn trong 20 phút. 100µl UA được thêm vào bộ phận lọc và ly tâm ở tốc độ 14000 xg trong 15 phút. Bước này được lặp lại hai lần. 100µl NH_4HCO_3 (amoni bicacbonat, ABC) 0,05M trong nước được thêm vào bộ phận lọc và ly tâm ở tốc độ 14000 xg trong 10 phút. Bước này được lặp lại hai lần. 40µl ABC cùng với 15µl nguyên liệu gốc trypsin (1,5µg/µl, Sigma) được thêm vào và mỗi mẫu được khuấy trộn ở tốc độ 600 vòng/phút trong máy khuấy trộn nhiệt trong 1 phút. Bộ phận lọc được ủ trong ngăn ấm ở 37°C trong 4 -18 giờ để cắt enzym. Bộ phận lọc được chuyển vào các ống thu mới và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút, trong 10 phút. 40µl ABC được thêm vào và bộ phận lọc được ly tâm lần nữa ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 10 phút. Bước này được lặp lại một lần. Phân đoạn chảy ra được axit hóa bằng cách bổ sung 15µl axit formic 5% và làm đông khô. Peptit chiết tách, khô được tái tạo huyền phù trong 30µl axit formic 0,5% để phân tích bằng MRM.

Điều chế hèm rượu và bia

Lúa mạch được mạch nha hóa trong hệ Joe White Micromalting System trong một số hộp thiếc 800g. Chế độ ngâm bao gồm: 8 giờ tắm ướt, 9 giờ nghỉ, 5 giờ tắm ướt ở 17°C (Sloop); 8 giờ tắm ướt, 10 giờ nghỉ, 5 giờ tắm ướt ở 17°C (Risø 56); và 7 giờ tắm ướt, 8 giờ nghỉ, 3 giờ tắm ướt ở 17°C (Risø 1508). Sự nảy mầm xảy ra hơn 94 giờ ở 16°C đối với Sloop và 15°C đối với hai biến dị đoạn khuyết hordein. Chương trình sấy được đặt trong 21 giờ ở nhiệt độ 50- 80°C. Mạch nha đã nung được ủ như được mô tả chi tiết trong Colgrave et al. (2012). Sau thời gian nghỉ amylaza cần thiết, khối bột ủ được đem đun sôi và để sôi trong 1 giờ để tạo ra hèm rượu. Trong lúc sôi, hèm rượu đang sôi được làm đắng bằng hoa bia Tettnang để đạt được 21-22 IBU. Hèm rượu được làm nguội qua đêm đến 20°C và sau đó lên men bằng nấm men Fermentis US-05 ở 18-20°C để hoàn thành sau khoảng 2 tuần. Bia chưa lọc được cho vào thùng chứa, và cacbonat hóa cưỡng bức trước khi đóng chai.

Phân tích bia

Lựa chọn 60 loại bia thương mại như được liệt kê trong Bảng phụ 1 nêu trong Colgrave et al. (2012). Các mẫu lặp ba (1ml) được lấy ra từ hai chai khác nhau của mỗi loại và loại khí để loại bỏ CO_2 trong điều kiện áp suất giảm. Các phần phân ước (100µl) bia đã được loại khí được lấy ra và khử bằng cách bổ sung 20µl DTT 50mM trong điều

kiện N_2 trong 30 phút ở $60^\circ C$. Dung dịch này được bổ sung $20\mu l$ iodoacetamid (IAM) $100mM$ và mẫu được ủ trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Mỗi $5\mu l$ dung dịch chứa trypsin (Sigma) hoặc chymotrypsin (Sigma) $1mg/ml$ được thêm vào và mẫu được ủ ở $37^\circ C$ qua đêm. Dung dịch peptit đã cắt được axit hóa bằng cách bổ sung $10\mu l$ axit formic 5% và cho đi qua bộ lọc MW $10kDa$ (Pall, Australia). Phần lọc được làm đông khô và hoàn nguyên trong axit formic 1% và bảo quản ở $4^\circ C$ cho đến khi phân tích.

Phân tích hèm rượu và bia không được cắt

Hèm rượu và bia ($0,1ml$) được tạo ra từ lúa mạch kiểu đại (Sloop) và các biến dị đoạn khuyết hordein được cho qua bộ lọc cắt trọng lượng phân tử $10kDa$ (Pall) bằng cách ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 30 phút để tạo ra phân đoạn peptit để phân tích LC-MS/MS. Phân đoạn peptit này ($10\mu l$) được phân tích trên phổ kế khối lượng QStar Elite.

Q-TOF MS

Mẫu được tách sắc ký trên hệ Shimadzu nano HPLC (Shimadzu Scientific, Rydalmere, Australia) bằng cách sử dụng cột Vydac MS C18 $300\text{\AA}$ ($150mm \times 0,3mm$) có kích thước hạt bằng $5\mu m$ (Grace Davison, Deerfield, USA) bằng cách sử dụng gradien tuyến tính dung môi B $2-42\%$ trong 20 phút ở tốc độ dòng $3\mu l/phút$. Pha động bao gồm dung môi A (axit formic $0,1\%$) và dung môi B (axit formic $0,1\%$ /axetonitril $90\%/nước\ 10\%$). Phổ kế khối lượng QStar Elite QqTOF (Applied Biosystem) được sử dụng theo phương thức thu nhận phụ thuộc số liệu MS/MS chuẩn với nguồn ion hóa phun điện tử nano. Phổ khối MS khảo sát được thu hồi ($m/z=400-1800$) trong 1 giây, tiếp đó ba phép đo MS/MS trên các ion mẹ mạnh nhất (ngưỡng 10 số đếm/giây, trạng thái điện tích từ $2+$ đến $5+$, và khoảng khối lượng $m/z=100-1600$ đối với MS/MS), bằng cách sử dụng 'Smart Exit' của nhà sản xuất. Các ion mẹ đã được tạo đích trước được loại trừ ra khỏi sự thu nhận MS/MS lặp trong 30 giây (dung sai khối lượng $100\ mDa$).

Phổ khối (ba mạch bốn cực) bẫy ion tuyến tính

Các peptit trypsin đã được khử và alkyl hóa được phân tích trên máy phổ khối Applied Biosystems 4000 QTRAP (Applied Biosystem, Framingham, MA, USA) được trang bị nguồn ion hóa TurboV hoạt động theo phương thức ion dương. Mẫu được tách sắc ký trên thiết bị Shimadzu Nexera UHPLC (Shimadzu) bằng cách sử dụng cột Phenomenex Kinetex C18 ($2,1mm \times 10cm$) có gradien tuyến tính axetonitril (ACN) $5-45\%$ trong 15 phút với tốc độ dòng $400\mu l/phút$. Dung môi rửa giải từ HPLC được trực

tiếp đưa vào phổ kế khối lượng. Số liệu được ghi lại và xử lý bằng cách sử dụng phần mềm Analyst 1.5 softwareTM. Các phân tích ở chế độ IDA (Information Dependent Acquisition: thu nhận phụ thuộc thông tin) được thực hiện bằng cách sử dụng phép quét MS tăng cường (EMS: enhanced MS) trên khoảng khối lượng 350-1500 dưới dạng quét khảo sát và khởi động sự thu nhận phổ khối ghép nối. Hai ion đỉnh có trạng thái điện tích 2-5 vượt quá giá trị ngưỡng xác định (100000 số đếm) được lựa chọn và đầu tiên được quét với độ phân giải tăng cường (ER: enhanced resolution) trước khi thực hiện việc quét sản phẩm tăng cường (EPI: enhanced product scan) trên khoảng khối lượng 125-1600.

Phân tích phổ khối và thăm dò số liệu

Phần mềm ProteinPilotTM 4.0 (Applied Biosystem) với thuật toán mô hình (Paragon Algorithm) được sử dụng để xác định protein. Số liệu phổ khối ghép nối được thăm dò lần nữa sự cắt trypsin hoặc chymotrypsin *in silico* của protein Triticeae của cơ sở dữ liệu Uniprot (Universal Protein Resource, phiên bản 2011/05) và NCBI (The National Center for Biotechnology Information, version 2011/05). Mọi thông số thăm dò được xác định dưới dạng iodoacetamid được cải biến bằng sự alkyl hóa cystein, trong đó hoặc trypsin hoặc chymotrypsin là enzym cắt. Sự cải biến được đặt ở hệ cải biến “xử lý di truyền” và “sinh học” được cung cấp cùng với gói phần mềm này, mà bao gồm 126 cải biến có thể, ví dụ, axetyl hóa, metyl hóa và phosphoryl hóa. Các hệ cải biến xử lý di truyền chứa 51 cải biến có thể mà có thể xảy ra dưới dạng kết quả của việc xử lý mẫu, ví dụ, oxy hóa, loại nước và loại amin. Peptit có một sự phân cắt bị bỏ qua cũng thuộc phép phân tích này.

Xây dựng và ứng dụng của cơ sở dữ liệu ngũ cốc được xây dựng theo yêu cầu (Custom-Built Cereal Database)

Cơ sở dữ liệu của protein dự trữ trong hạt ngũ cốc theo yêu cầu không dư thừa (non-redundant) được xây dựng bằng cách bao gồm tất cả các trình tự protein đã báo cáo từ mục nhập nucleotit trong Danh mục gen của NCBI, TIGR (NCBI, TIGR Gene Indices), hoặc Bộ phiên mã thực vật của TIGR (TIGR Plant Transcript Assemblies) thuộc về các loài *Triticum*, *Hordeum*, *Avena*, *Secale* và *Triticosecale*. Trình tự nucleotit, đối với các loài nêu trên, được dịch mã trong sáu khung, cắt để giữ chỉ khung đọc mở dài nhất. Sau đó, bộ trình tự protein tạo ra được làm cho không dư thừa. Chỉ các trình tự khớp 100% từ đầu đến cuối được làm suy yếu đồng thời, để duy trì tất cả các biến dị.

Cuối cùng, các hồ sơ này được lọc để giữ lại chỉ các mục nhập chứa các từ gluten, gliadin, glutenin, hordein, avenin hoặc secalin. Số liệu phổ khối nối ghép nối được khảo sát đối với cơ sở dữ liệu ngũ cốc theo yêu cầu.

Sắp thẳng hàng protein và xác định peptit kiểu gốc

Toàn bộ các protein hordein đã biết trong cơ sở dữ liệu của Uniprot và protein hordein phỏng đoán trong cơ sở dữ liệu của TIGR được sắp thẳng hàng. Trong mỗi họ (B, C, D hoặc γ), peptit thường được lựa chọn làm đại diện của họ. Chế độ chuyển tiếp MRM được xác định đối với mỗi peptit, tại đó giá trị m/z của tiền ion (Q1) dựa trên kích thước và điện tích kỳ vọng và giá trị m/z của ion mảnh (Q3) được phỏng đoán bằng cách sử dụng các kiểu phân mảnh đã biết và/hoặc số liệu được thu hồi trong các tiến trình xử lý đặc trưng. Có đến 6 chuyển tiếp được sử dụng trong việc phân tích sơ bộ và các chuyển tiếp MRM được làm mịn và hai chuyển tiếp MRM đỉnh được lựa chọn đối với mỗi peptit để sử dụng trong phương pháp cuối cùng, trong đó chuyển tiếp MRM có cường độ mạnh nhất được sử dụng để định lượng và chuyển tiếp có cường độ mạnh nhất thứ hai được sử dụng để định tính.

Phổ khối MRM

Kỹ thuật ghi phổ MRM được sử dụng để định lượng peptit trypsin được tạo ra từ hordein. Đối với cả hai thử nghiệm MS/MS được khơi mào bằng chế độ IDA và MRM, tốc độ quét được đặt ở 1000Da/giây và peptit được phân mảnh trong buồng va chạm bằng khí nitơ bằng cách sử dụng năng lượng va chạm dao động ngang phụ thuộc vào kích thước và điện tích của tiền ion. Việc định lượng peptit hordein đạt được bằng cách sử dụng các thử nghiệm quét MRM được lập lịch biểu có sử dụng cửa sổ phát hiện 120 giây đối với mỗi chuyển tiếp MRM và thời gian chu trình là 1 giây. Tứ cực thứ nhất được sử dụng để chọn lọc tỷ lệ khối lượng-điện tích (m/z) của chất gắn, mà được gọi là tiền ion. Sau đó, tiền ion được chuyển đến buồng va chạm (tứ cực thứ hai). Sự phân ly do va chạm (CID: collision-induced dissociation) tạo ra các mảnh vỡ ion mà được chuyển vào tứ cực thứ ba. Giai đoạn thứ hai của việc lựa chọn khối lượng xảy ra sự hướng đích đặc hiệu các giá trị m/z của các mảnh vỡ ion đã biết. Hai giai đoạn lựa chọn khối lượng được biết đến là Q1 và Q3 liên quan tới tứ cực trong đó chúng xảy ra. Do đó, chuyển tiếp Q1 đến Q3 là đã biết là chuyển tiếp MRM và rất đặc hiệu và chọn lọc đối với chất phân tích lựa chọn.

Định lượng tương đối hordein

Việc định lượng tương đối của mỗi hordein được thực hiện bằng cách tích phân diện tích đỉnh của chuyển tiếp MRM có cường độ mạnh nhất đối với mỗi peptit. Diện tích đỉnh trung bình được xác định bằng cách lấy giá trị trung bình của hai lần tiêm bản sao (vào các ngày khác nhau) từ bình A và B (thể hiện các bản sao sinh học). Các kết quả được thể hiện dưới dạng phần trăm mỗi protein hordein tương đối với hàm lượng trung bình của hordein của tất cả các loại bia chứa gluten.

Ví dụ 2

Xác định tính chất của hordein trong bột lúa mạch

Hordein được chiết từ bột lúa mạch (kiểu đại cv Sloop) bằng cách hòa tan vào dung dịch rượu được tinh chế bằng FPLC như được mô tả trong Ví dụ 1. Phân đoạn hordein đã tinh chế được khử, alkyl hóa và cắt bằng hoặc trypsin hoặc chymotrypsin. Sau khi cắt enzym, phân đoạn dưới 10kDa được phân tích bằng phương pháp LC-MS/MS để xác định hordein có mặt trong phân đoạn prolamin đã được tinh chế ra khỏi bột để tạo ra một bộ đầy đủ các protein hordein mà có thể được kỳ vọng là được tìm thấy trong bia được nấu từ bột này. Bằng cách sử dụng tỷ lệ phát hiện sai hỏng (FDR: false discovery rate) bằng 1%, tổng cộng 144 protein được xác định sau khi cắt trypsin và tổng cộng 55 protein được xác định sau khi cắt chymotrypsin.

Bảng 1 liệt kê các sản phẩm protein hordein được phát hiện từ bột sau khi cắt trypsin. Trong số các protein dư thừa nhất được phát hiện là B3-hordein (Số đăng ký P06471, Kristoffersen et al., 2000), γ -3-hordein (P80198, Fasoli et al., 2010) đã được báo cáo trước đây và γ -1-hordein đã phỏng đoán (P17990, Cameron-Mills et al., 1988). Cũng như thế, D-hordein (Uniprot: Q84LE9, Gu et al., 2003) được phát hiện với lượng rất nhiều. Các protein khác dư thừa ít hơn được phát hiện bao gồm hai γ -hordein và một B1-hordein mà không có mặt trong các cơ sở dữ liệu của NCBI hoặc Uniprot (Bảng 1). Các protein này được xác định bằng cách tìm kiếm cơ sở dữ liệu được xây dựng theo yêu cầu chứa protein ngũ cốc đã dịch mã từ mục nhập nucleotit trong Danh mục gen của NCBI, TIGR, hoặc Bộ phiên mã thực vật của TIGR. Một số peptit so khớp với γ -gliadin và glutenin đã phỏng đoán (từ lúa mì) và protein-A kiểu avenin (từ lúa mì và cỏ goat-grass) được phát hiện. Protein A kiểu avenin được báo cáo là có mặt trong bia (Picariello et al., 2011) dựa trên việc phát hiện peptit có 15 axit amin (QQCCQPLAQISEQAR, SEQ ID NO: 5) tạo ra từ việc cắt trypsin của dải protein 16-17kDa phân lập bởi SDS-PAGE. Trình tự peptit khớp với trình tự trong protein riêng rẽ

từ lúa mạch như được xác định bằng khảo sát BLASTp, cùng với peptit có 13 axit amin (aa) khác khớp với cùng một trình tự protein đã được phỏng đoán (Uniprot: F2EGD5). Peptit 11 aa (MVLQTLPSMCR, SEQ ID NO: 6) tương ứng với protein A kiểu avenin (Uniprot: Q2A782) từ *Aegilops cylindrica* (cỏ goatgrass có khớp) cũng được phát hiện. Nghiên cứu tiếp theo về cơ sở dữ liệu EST được dịch mã (TIGR) cho biết protein *H. vulgare* giải thích peptit 11 aa. Dựa trên độ tương đồng giữa protein-A kiểu avenin đã phỏng đoán và protein γ -hordein, chúng được sử dụng trong các phân tích tiếp theo.

Việc nhận biết peptit riêng lẻ gợi ý sự có mặt của C-hordein trong phân đoạn hordein, tuy nhiên, sự sắp thẳng hàng trình tự của protein C-hordein đã biết cho thấy sự vắng mặt của vị trí tách trypsin trong protein giàu glutamin này. Kết quả là, sự cắt chymotrypsin của phân đoạn hordein tạo ra sự nhận biết C-hordein có độ che phủ trình tự lên tới 80% (bảng 2), nêu bật nhu cầu cần có phương pháp cắt khác để xác định tính chất của nhóm hordein này.

Bảng 1. Protein prolamin được nhận biết trong phân đoạn bột lúa mạch đã được tinh chế bằng phương pháp FPLC sau khi cắt trypsin

Số đăng ký Uniprot	Số đăng ký NCBI	Số đăng ký TIGR	Tên gọi	Điểm số	Độ bao phủ	Peptit
-	-	BE454297	B3-hordein ***	57,03	87,1	52
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -hordein-3	38,40	54,0	32
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-hordein **	34,70	55,6	41
P17990	123464	-	γ -hordein-1	27,70	74,7	23
-	-	TA30139_4513	γ -hordein ***	18,95	45,5	24
Q40026	75220903	TA29493_4513	B1-hordein **	8,58	46,6	19
Q4G3S1	122220129	-	B3-hordein *	5,55	15,7	10
P06472	123460	-	C-hordein *	4,56	23,9	4
C7FB16	255348358	-	B-hordein **	4,00	22,4	22
Q2A782	122238432	-	Kiểu avenin A *	4,00	14,4	2
F2XAR6	327365751	-	γ -gliadin **	3,89	9,5	3
-	-	TA29452_4513	B1-hordein ***	3,87	52,2	18
P17991	123461	-	C-hordein *	3,87	95,8	3
-	-	AJ433315	γ -hordein ***	3,53	99,1	19
P06471	123459	HVB3HORD	B3-hordein	2,00	73,1	42

B9VSH7	222538169	-	D-hordein (tương tự với HMW glutenin) **	2,00	16,1	9
Q3YAF9	122217636	-	B-hordein **	2,00	21,7	8
B5A818	-	-	B-hordein (tương tự với LMW glutenin) **	2,00	27,2	7
D4HNB5	-	-	B-hordein (tương tự với LMW glutenin) **	2,00	13,2	4
Q8S3W0	75159492	-	D-hordein (tương tự với HMW glutenin) **	2,00	5,0	6
F2EGD5	326501830	-	Kiểu avenin A *	2,00	16,2	2

Số đăng ký đối với mỗi protein được liệt kê: * cho biết chứng cứ phiên mã đã chú giải hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); ** cho biết protein đã phỏng đoán là có nguồn gốc hệ gen hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); *** cho biết protein mới được nhận biết theo tra cứu cơ sở dữ liệu dựa vào TIGR EST không được chú giải.

Bảng 2. Protein prolamin được nhận biết trong phân đoạn bột lúa mạch đã được tinh chế bằng phương pháp FPLC sau khi cắt chymotrypsin

Số đăng ký Uniprot	Số đăng ký NCBI	Số đăng ký TIGR	Tên gọi	Điểm số	Độ che phủ	Peptit
P06471	123459	HVB3HORD	B3-hordein	85,95	86,4	51
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-hordein **	54,28	36,2	28
Q41210	75102504	-	C-hordein **	50,10	88,7	44
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -hordein-3	36,38	69,9	19
Q40053	19001	-	C-hordein (Hor1-17) **	28,93	83,9	41
-	-	TA30139_4153	γ -hordein ***	21,31	59,2	11
P06470	123458	-	B1-hordein	10,13	25,1	14
Q0PIV6	110832715	-	B-hordein **	10,00	62,4	22
P17990	123464	-	γ -hordein-1 *	8,00	50,9	7
P17992	123462	-	C-hordein *	6,02	65,1	7
Q571R2	75271341	-	C-hordein (tương tự với σ -gliadin) *	4,00	61,3	3
-	-	TA29452_4513	B1-hordein ***	2,13	59,4	14
C7FB16	255348358	-	B-hordein **	2,02	61,9	15
-	-	TA28105_4153	Tương tự với C-hordein ***	2,01	53,4	1
-	-	BG416634_F0	B3-hordein ***	2,00	81,5	32
		BI950745_F1	B3-hordein ***	2,00	33,6	15
-	-	TA29459_4513	B-hordein (tương tự với	2,00	60,9	12

			GBSS Wx-TmA) ***			
Q5PU42	56126405	-	B-hordein (tương tự với LMW glutenin) **	2,00	22,6	6
Q4G3S5	57118089	-	B3-hordein *	2,00	24,0	6

Số đăng ký đối với mỗi protein được liệt kê: * cho biết chứng cứ phiên mã đã chú giải hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); ** cho biết protein đã phỏng đoán là có nguồn gốc hệ gen hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); *** cho biết protein mới được nhận biết theo tra cứu cơ sở dữ liệu dựa vào TIGR EST không được chú giải.

Ví dụ 3

Xác định tính chất của hordein trong hèm rượu và bia

Phân tích hèm rượu, chất lỏng chiết tách được từ bước ủ trong quá trình nấu bia, và bia được tạo ra sau đó và một loạt các prolamin tương tự được xác định (Bảng 3). Tổng cộng 27 protein được xác định trong hèm rượu và 79 trong bia, với hầu hết các protein dư thừa là protein chuyển lipid 1 không đặc hiệu (LTP1: lipid transfer protein 1) và chất ức chế α -amylaza trypsin (CMd, CMb, CMa). Protein gluten được nhận biết trong hèm rượu bao gồm protein A kiểu avenin (18 peptit), γ -hordein-3 (10 peptit) và D-hordein (4 peptit) mà trước đây đã nhận được trong phân đoạn hordein được làm giàu. Tuy nhiên, cần chú ý rằng >50% peptit là bán trypsin (được tách ở một đầu tại vị trí không phải là Lys/Arg), đề xuất rằng sự thoái biến đáng kể của protein xảy ra trong quá trình nấu bia. Protein A kiểu avenin (Số đăng ký GenBank No. BE195337) nhận biết được từ tra cứu cơ sở dữ liệu EST được phát hiện có sự bao phủ trình tự >60% (12 peptit) làm tăng độ tin cậy của việc nhận biết protein này.

Đáng quan tâm là protein C-hordein không có mặt trong bia, nhưng để đảm bảo nó không phải là một khẳng định sai do số lượng thấp của các vị trí trypsin, việc cắt chymotrypsin được thực hiện đã xác nhận sự vắng mặt của C-hordein trong bia (Bảng 3). Sự vắng mặt của C-hordein có thể liên quan tới tính không hòa tan của nó trong nước. C-hordein chứa nhiều đoạn lặp octapeptit có trình tự liên ứng PQQPFPQQ (SEQ ID NO: 7) làm cho chúng rất khó tan. Nhiều sản phẩm thoái biến C-D hordein được nhận biết trong hèm rượu nhưng không tồn tại trong các bước nấu bia và lọc dẫn đến sự tạo ra bia.

Để xác định tính chất của các mảnh peptit, hèm rượu và bia được cho qua bộ lọc

cắt trọng lượng phân tử 10kDa và phân tích mà không cần cắt enzym. Phép phân tích 1D-PAGE cho biết rằng bước lọc có hiệu quả trong việc loại bỏ protein ra khỏi bia. Phép phân tích MS cho thấy sự có mặt của một số sản phẩm hordein đã bị cắt ngắn hoặc bị thoái biến. Bảng 4 liệt kê các mảnh peptit đã được nhận biết. Ngoài peptit hordein, peptit được tạo ra từ một số lượng lớn các protein lúa mạch bao gồm serpin-Z4, protein chuyển lipid 1 không đặc hiệu, α -amylaza, β -amylaza, hordoinol (B1, B2) và GAPDH được nhận biết trong hèm rượu và bia (được liệt kê trong Bảng 4 và Bảng phụ 2 của Colgrave et al., 2012). Đáng quan tâm là một số lượng lớn các mảnh C-hordein quan sát được trong hèm rượu chỉ với mức vết của peptit C-hordein phát hiện được trong bia.

Việc xác định tính chất của bia khi không cắt enzym chứng minh rõ ràng rằng ngoài hordein nguyên vẹn, một số lượng lớn các mảnh hordein đã bị thoái biến một phần có mặt và chúng có thể góp phần gây độc cho đường ruột. Nhiều mảnh peptit này chứa các dòng Gln và Pro mà có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch trong đường ruột. Ví dụ về peptit miễn dịch tiềm năng đã được phát hiện là FVQPQQQPFPLQPHQP (A kiểu avenin; GenBank: TA31086, SEQ ID NO: 8), YPEQPQQQFPWQQPT (γ -1-hordein; P17990, SEQ ID NO: 9), LERPQQQLFPQWQPLPQQPP (γ -3-hordein; P80198, SEQ ID NO: 10) và LIIPQQPQQPFPLQPHQP (C-hordein; P17991, SEQ ID NO: 11), trong đó trình tự gạch chân mang tính tương đồng cao với peptit miễn dịch đã được báo cáo trước đây (Tye-Din et al., 2010; Kahlenberg et al., 2006).

Bảng 3. Protein prolamin được nhận biết trong hèm rượu và bia.

Prolamin được nhận biết trong hèm rượu (cắt trypsin)						
Số đăng ký Uniprot	Số đăng ký NCBI	Số đăng ký TIGR	Tên gọi	Điểm số	Độ bao phủ	Peptit
F2EGD5	326501830	-	A kiểu avenin *	29,33	41,6	18
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -hordein-3	18,05	33,2	10
-	-	BE195337	Kiểu avenin A ***	14,00	47,0	9
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-hordein **	8,08	8,9	4
Prolamin được nhận biết trong bia (cắt trypsin)						
Số đăng ký Uniprot	Số đăng ký NCBI	Số đăng ký TIGR	Tên gọi	Điểm số	Độ bao phủ	Peptit
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -hordein-3	55,62	53,6	33
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-hordein **	30,16	22,2	23

P06471	18914	HVB3HORD	B3-hordein	17,81	24,6	9
P17990	123464	-	γ -hordein-1 *	16,98	31,9	9
-	-	BE195337	Kiểu avenin A ***	15,66	64,6	12
F2EGD5	326501830	-	Kiểu avenin A *	8,06	35,3	8
Q4G3S5	57118089	-	B3-hordein *	5,48	12,6	6
Q40026	75220903	TA29493_4513	B1-hordein **	2,01	8,6	7
Q94IL5	75250230	-	D-hordein (tương tự với HMW glutenin) **	2,00	4,6	8

Prolamin được nhận biết trong bia (cắt chymotripsin)

Số đăng ký Uniprot	Số đăng ký NCBI	Số đăng ký TIGR	Tên gọi	Điểm số	Độ bao phủ	Peptit
P80198	1708280	TA29416_4513	γ -hordein-3	19,75	56,1	12
Q40022	829269	-	B1-hordein *	13,80	51,4	9
Q84LE9	75147012	TA30219_4513	D-hordein **	12,00	26,0	6
P17990	123464	-	γ -hordein-1 *	5,59	22,5	3
F5A7G6	-	-	B-hordein (tương tự với LMW glutenin) **	2,00	23,2	5
Q6EEZ0	-	-	γ -hordein-3 **	2,00	25,8	2

Số đăng ký đối với mỗi protein được liệt kê: * cho biết chứng cứ phiên mã đã chú giải hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); ** cho biết protein đã phỏng đoán là có nguồn gốc hệ gen hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); *** cho biết protein mới được nhận biết theo tra cứu cơ sở dữ liệu dựa vào TIGR EST không được chú giải.

Bảng 4. Peptit được tạo ra từ protein hordein được phát hiện trong phân đoạn phụ-10kDa của bia

Các epitop được in đậm dưới đây thể hiện độ tương đồng trình tự cao với epitop gluten được nhận biết bởi Mendez R4 MAb tăng lên so với prolamin của lúa mạch đen (QQFPF (SEQ ID NO: 12), QQQFP (SEQ ID NO: 13), LQFPF (SEQ ID NO: 14), QLFPF (SEQ ID NO: 15))^a. Các peptit này có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch ở bệnh nhân CD.

Tên gọi ^b	Conf	Peptit	<i>m/z</i>	Khối lượng	Δm (ppm)
D-hordein (Q84LE9 **)	99	RVVDQQLVGQLPWSTG (SEQ ID NO: 16)	891,99	1781,97	13,41

	99	VVDQQLVGQLPWSTGL (SEQ ID NO: 17)	870,45	1738,89	19,72
	99	VVDQQLVGQLPWSTG (SEQ ID NO: 18)	813,93	1625,85	5,17
	99	VVDQQLVGQLPW (SEQ ID NO: 19)	691,38	1380,74	2,46
	99	QLVGQLPWSTGL (SEQ ID NO: 20)	649,85	1297,68	16,25
	99	QLVGQLPWSTG (SEQ ID NO: 21)	593,30	1184,59	22,03
	99	LVGQLPWSTGLQM (SEQ ID NO: 22)	715,37	1428,73	12,46
	99	LVGQLPWSTGL (SEQ ID NO: 23)	585,83	1169,65	5,55
	99	LVGQLPWSTG (SEQ ID NO: 24)	529,28	1056,54	14,86
	99	VGQLPWSTGLQM (SEQ ID NO: 25)	658,83	1315,64	14,06
	99	VGQLPWSTGL (SEQ ID NO: 26)	529,28	1056,54	16,75
	99	(p)QLAAQLPAMCRLEGS[HexNAc] (SEQ ID NO: 27)	887,41	1772,80	22,05
	99	VVRQYEQQTEVPSKGGSFYPGGTAP P (SEQ ID NO: 28)	927,12	2778,35	5,79
γ -3-hordein (P80198)	99	FVLPQQQAQFKVVGS (SEQ ID NO: 29)	838,46	1674,90	4,24
	99	FVLPQQQAQF (SEQ ID NO: 30)	603,31	1204,61	12,54
	99	AIVMQQQVQQQVGHGF (SEQ ID NO: 31)	899,43	1796,85	26,60
	99	LERPQQLFQWQPLPQQPP (SEQ ID NO: 32)	776,41	2326,19	12,21
	99	LFPQWQPLPQQPP (SEQ ID NO: 33)	788,41	1574,82	6,03
	99	LQQLGQGMPIQL (SEQ ID NO: 34)	663,85	1325,69	16,98
	95	VVGSLVIQT (SEQ ID NO: 35)	458,27	914,53	9,84
γ -1-hordein (P17990 *)	99	LQQPQHQPQPTQQFPQRPn (SEQ ID NO: 36)	777,39	2329,15	8,16
	99	YPEQPQQPFPWQQPT (SEQ ID NO: 37)	935,93	1869,84	16,15
	99	GVVQPQQLAQME (SEQ ID NO: 38)	664,31	1326,61	41,08
	99	[p]QPQHQPQPTQQFPQRP (SEQ ID NO: 39)	691,33	2070,98	9,90
Kiểu avenin A (BE195337 ***)	99	FVQPQQQVPVEITR (SEQ ID NO: 40)	834,94	1667,87	19,61
	99	FVQPQQQVPVEI (SEQ ID NO: 41)	706,37	1410,72	18,78
C-hordein (P17991 *)	98,2	LIIPQQPQQPFLQPHQP (SEQ ID NO: 42)	1053,59	2105,17	14,82

	99	IIPQQPQQPFPLQPHQP (SEQ ID NO: 43)	997,05	1992,08	13,40
B3-hordein (P06471)	98,4	VQVQIPFVHPSI (SEQ ID NO: 44)	682,38	1362,74	16,22
Kiểu avenin A (F2EGD5 *)	99	SFGQPQQQVPVEVMR (SEQ ID NO: 45)	865,43	1728,84	13,0
C-hordein (Q40053 *)	95,8	IIPQQPFPLQPPFPQQPQQPLPQPQ QP (SEQ ID NO: 46)	1081,25	3240,73	11,08
C-hordein (TA28105 ***)	96,4	IPLQPQ[Dea]QPFPPQQPP (SEQ ID NO: 47)	808,40	1614,79	30,53

a. Kahlenberg et al. (2006).

b. Số đăng ký đối với mỗi protein được liệt kê: * cho biết chứng cứ phiên mã đã chú giải hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); ** cho biết protein đã phỏng đoán là có nguồn gốc hệ gen hỗ trợ nhận biết protein (Uniprot); *** cho biết protein mới được nhận biết theo tra cứu cơ sở dữ liệu dựa vào TIGR EST không được chú giải.

Ví dụ 4

Định lượng tương đối hordein trong bia bằng phương pháp phổ khối MRM

Việc xác định đặc tính protein học của hordein đã được tinh chế và bia trong các Ví dụ 2 và 3 cho phép giải thích protein hordein chủ yếu có mặt trong lúa mạch. Phương pháp theo dõi đa phản ứng (MRM: multiple reaction monitoring) được cho là công cụ hữu hiệu để định lượng peptit và protein. Theo phương pháp này, sau khi cắt tripsin của protein, các mảnh hủy protein được tách sắc ký bằng phương pháp HPLC và phân tích bằng phổ khối MRM. Tứ cực thứ nhất (Q1) chọn lọc giá trị m/z peptit thứ nhất (khối lượng tiền chất) và chuyển ion này đến buồng và chạm (Q2). Sự phân ly do va chạm tạo ra một loạt các mảnh ion liên quan đến trình tự axit amin của các mảnh do phân giải protein. Các ion mảnh chẩn đoán này, sau đó, được lựa chọn ở tứ cực thứ ba (Q3) và chuyển vào bộ phát hiện cho phép định lượng peptit đang quan tâm. Thông thường, ba chuyển tiếp MRM mỗi peptit được sử dụng và ít nhất hai peptit mỗi protein.

Từ mỗi họ protein, protein đồng dạng được chọn để theo dõi hàm lượng gluten của bia được nấu từ dòng lúa mạch được trồng một cách chọn lọc (xem dưới đây). Nhiều peptit trypsin (≥ 2 peptit/protein) được chọn để mở rộng thử nghiệm định lượng. Trong đó các peptit đã được phát hiện trước trong thử nghiệm phát hiện, thông tin m/z của peptit và ion mảnh được sử dụng để xác định chuyển tiếp MRM được sử dụng. Số lượng peptit mà ban đầu chưa được xác định được tính đến trong thử nghiệm MRM sao cho số lượng tối thiểu hai peptit mỗi protein được sử dụng. Trong các trường hợp này,

thời gian lưu là không biết và chuyển tiếp MRM không thể được lập lịch biểu trong các thử nghiệm chuyển qua đầu tiên. Thời gian lưu peptit được xác định và các thử nghiệm tiếp theo được sử dụng các chuyển tiếp MRM đã được lập lịch biểu.

Bia được tạo ra từ lúa mạch nha hóa elite Australian riêng lẻ (“Sloop”) được sử dụng để phát triển và tinh chỉnh phương pháp MRM vì nó chứa bộ thể đầy đủ của protein hordein, trong đó các dòng lúa mạch biến dị (Risø 56 và Risø 1508) được kỳ vọng là có hàm lượng B- và C-hordein thấp hoặc không chứa B- và C-hordein. Khi bia được nấu từ mẫu hạt lúa mạch kiểu đại và hạt đột biến hordein (Risø 56 và Risø 1508) được phân tích bằng cách sử dụng phép phân tích MRM, tám peptit chọn lọc (ba chuyển tiếp MRM mỗi peptit) đều được quan sát rõ ràng từ bia có nguồn gốc lúa mạch kiểu đại. Bia có nguồn gốc Risø 56 cho thấy mức giảm lượng peptit D-hordein khoảng 3 lần và đáng quan tâm là peptit B-hordein không có mặt. Bia có nguồn gốc từ Risø 1508 cho thấy sự giảm tiếp lượng mỗi peptit đo được, nhưng vẫn quan sát được lượng vết của protein A kiểu avenin.

Khả năng lặp lại phương pháp phân tích này được đánh giá bằng cách kiểm tra bia có nguồn gốc từ lúa mạch trồng riêng lẻ (“Sloop”). Thứ nhất, bia được trải qua nhiều chu kỳ đông lạnh-làm tan băng (1, 10, 20 hoặc 50 chu kỳ) và không quan sát thấy sự thay đổi đáng kể (hệ số biến thiên (CV: coefficient of variation) <15%) diện tích đỉnh đối với mỗi chuyển tiếp MRM được theo dõi ngay cả sau 50 chu kỳ. Thứ hai, hiệu quả cắt được kiểm tra bằng sáu phép cắt lặp lại tạo ra CV <15%. Khả năng lặp lại trong phân tích được đánh giá bằng cách thực hiện bốn lần tiêm lặp lại của mỗi phép cắt với CV <15%. Cuối cùng, sự biến thiên của hàm lượng hordein giữa hai chai bia khác nhau được đánh giá và phát hiện là <10%.

Phân tích bia thương mại

Sự xác nhận tiếp theo của phương pháp MRM trong việc định lượng hordein trong bia được đưa ra bằng cách phân tích hàm lượng gluten của 60 loại bia thương mại kể cả bia được dán nhãn hàm lượng gluten thấp và bia được dán nhãn không chứa gluten. Hai mẫu lặp từ các chai riêng rẽ được xử lý bằng cách khử, alkyl hóa và cắt (Ví dụ 1) và được phân tích bằng phương pháp phổ khối MRM. Fig.2 thể hiện sự định lượng tương đối protein A kiểu avenin (A), B- hordein (B, C), D-hordein (D) và γ -hordein (E) trong bia thương mại liên quan đến Sloop. Liên quan đến các giá trị trung bình của bia không phải bia không chứa gluten, bia thương mại được quan sát để thay đổi về loại (họ

hordein có mặt) và lượng (từ 1-380% cf. trung bình đối với protein hordein bất kỳ đã cho). Tám loại bia (số 17, 47, 49, 50, 51, 52, 58 và 60) được dán nhãn là không chứa gluten vì chúng được nấu từ mạch nha hạt cao lương, hạt teff, hạt gạo, hạt kê hoặc hạt ngô. Các ngũ cốc này không chứa các protein gluten mà có mặt trong lúa mạch và lúa mì. Thử nghiệm MRM xác nhận rằng chúng không chứa protein hordein và protein liên quan đến hordein (kiểu avenin A). Bia 17 và 50- 52 có nguồn gốc từ hạt cao lương, bia 47 không xác định được nguyên liệu sản xuất, bia 49 có nguồn gốc từ hạt kê, bia 58 được nấu từ mạch nha hạt cao lương, teff và gạo và bia 60 là bia được tạo ra từ nguồn không phải ngũ cốc. Trong thử nghiệm của hai loại bia (57 và 59) mà được phân loại là có hàm lượng gluten thấp (<10ppm), hàm lượng hordein không giống với hàm lượng hordein trung bình của loại bia được thử nghiệm. Bia 57 cho thấy mức protein A kiểu avenin thấp (~50% cf. trung bình), nhưng ngạc nhiên là lại thể hiện mức peptit đáng kể được tạo ra từ B1- (>300% cf. trung bình), D- (~105%) và γ 3- hordein (~62%). Bia 59, thể hiện mức thấp nhưng đáng kể của B1-, D- và γ - hordein (tương ứng là 55%, 42% và 92%) và mức tương đương của protein A kiểu avenin với các mức quan sát được ở bia chứa gluten.

Kết luận

Bia được sản xuất từ lúa mạch chứa gluten được tạo ra từ hạt được sử dụng trong quá trình nấu bia. Hàm lượng gluten trong bia có thể được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA, tuy nhiên, có nhiều hạn chế đi kèm với việc đo chính xác hàm lượng hordein bằng cách sử dụng công nghệ ELISA hiện tại. Trong các ví dụ nêu trên, thử nghiệm phổ khối được phát triển để xác định tính chất của một dãy hoàn chỉnh các hordein trong các chế phẩm hordein tinh chế, hèm rượu và bia và để thực hiện việc định lượng tương đối các protein hordein dư thừa nhất. Thử nghiệm sử dụng phổ phối mạnh và nhạy đối với phép đo hordein (gluten) trong bột, hèm rượu và bia và có thể dễ dàng được áp dụng đối với mạch nha.

Ví dụ 5

Nhận biết đột biến vô hiệu ở gen *Hor3* của lúa mạch

Polypeptit D-hordein lúa mạch 105kDa được mã hóa bởi gen *Hor3* trên nhánh dài của nhiễm sắc thể 1H (Gu et al., 2003). Một giống lúa mạch kiểu đại được ký hiệu là Ethiopian R118 được nhận biết là không tích tụ D-hordein (Brennan et al., 1998) và thu được từ nguồn lưu trữ chất mầm nguyên sinh có sẵn (The John Innes Centre Public Collections, Số đăng ký 3771). Dòng này là lúa mạch kiểu đại, rất không thích hợp để

sản xuất hạt trong thương mại.

Hạt của Ethiopia R118 được gieo trong nhà kính. Cây tạo ra được quan sát để tách thành các kiểu hình 2-hàng và 6-hàng và đối với hạt đen, có màu và hạt xanh lá. Dòng 2-hàng tạo ra hạt xanh lá được chọn và lai với cv Sloop. Các nửa hạt F2 không tạo ra D-hordein được lựa chọn. Cây của dòng này được cho lai trở lại với Sloop kiểu đại và cây F2 không chứa D-hordein được lựa chọn lần nữa. Cây này được lai trở lại với Sloop và cây thế hệ con được lai trở lại lần nữa để tạo ra dòng BC₂ mà không sản sinh D-hordein cùng dòng mà có khoảng 87,5% hệ gen của Sloop.

Gen mã hóa D-hordein được khuếch đại từ ADN hệ gen phân lập từ mỗi cây Sloop BC₂ không sản sinh D-hordein được tạo ra từ Ethiopia R118 và Sloop kiểu đại. Việc này được thực hiện bằng phương pháp PCR với các điều kiện chuẩn và tạo ra một loạt gồm 3 các mảnh xen phủ. Các cặp mồi được sử dụng trong quá trình khuếch đại là:

Mảnh 1

5' Dhor1 GACACATATTCTGCCAAAACCCC (SEQ ID NO: 60) và

3' Dhor3 ACGAGGGCGACGATTACCGC (SEQ ID NO: 61)

Mảnh 2

5' Dhor1b GAGATCAATTCATTGACAGTCCACC (SEQ ID NO: 62), và

3' Dhor1 CTTGTCCTGACTGCTGCGGAGAAA (SEQ ID NO: 63)

Mảnh 3

5'Dhor2 GCAACAAGGACACTACCCAAGTATG (SEQ ID NO: 64), và

3' Dhor2 GCTGACAATGAGCTGAGACATGTAG (SEQ ID NO: 65)

Sản phẩm khuếch đại được tinh chế và trình tự nucleotit của mỗi sản phẩm được xác định. Trình tự kết hợp từ Sloop dài 2838bp (SEQ ID NO: 72) và trình tự được tạo ra từ Ethiopia R118 dài 2724bp (SEQ ID NO: 73). Codon bắt đầu dịch mã ATG đã được phỏng đoán đối với cả hai protein là ở vị trí 398-400 của các trình tự tương ứng. Đối với Sloop, codon kết thúc là ở vị trí nucleotit 2641-2643, mã hóa protein có 747 gốc axit amin. Phân tích trình tự từ Ethiopia R118 bộc lộ rằng khi so sánh với Sloop, có sự thay đổi từ C thành G ở vị trí 848 (vị trí 450 tương đối với codon bắt đầu) đưa codon kết thúc TAG trong khung vào gen *Hor3* mà gây ra sự cắt bỏ polypeptit ở vị trí 150 trong protein (Fig.3). Polypeptit D-hordein đã bị cắt này ở trước vùng giàu prolin và glutamin chứa các epitop được nhận biết là tạo miễn dịch cho đường ruột.

Sự thể nucleotit này phá hủy vị trí *KpnI* mà có mặt trong trình tự nucleotit kiểu đại

ở giống lúa mạch Sloop và cho phép sự phát triển của chỉ thị CAPS đồng trội. Đối với mục đích này, mảnh ADN có chiều dài 272bp được khuếch đại bằng cách sử dụng đoạn mồi 5' Dhor-chỉ thị (GGCAATACGAGCAGCAAAC, SEQ ID NO: 66) và 3' Dhor-chỉ thị (CCTCTGTCCTGGTTGTTGTC, SEQ ID NO: 67) (Fig.4). Sau đó, sản phẩm khuếch đại được ủ bằng enzym giới hạn *KpnI* và điện di trên gel agarosa. Mảnh từ giống lúa mạch kiểu dại Sloop được cắt bằng *KpnI* để tạo ra hai mảnh có chiều dài 164bp và 108bp. Ngược lại, mảnh có chiều dài 272bp từ Ethiopia R118 không chứa D-hordein không được cắt. Do đó, phương pháp này phân biệt rõ ràng các alen kiểu dại và vô hiệu đối với gen mã hóa D-hordein.

Ví dụ 6. Nhận biết chỉ thị phân tử đối với đột biến đoạn khuyết ở locus *Hor2* của lúa mạch

Locus *Hor2* trên nhánh gần của nhiễm sắc thể 1H trong lúa mạch là một họ khoảng 20-30 gen, mỗi gen mã hóa B-hordein có kích thước khoảng 36- 45kDa (Anderson et al., 2013). Riso 56 là đột biến do tia gama gây ra có đoạn khuyết khoảng 86kb bao gồm toàn bộ hoặc gần như toàn bộ gen B-hordein (Kreis et al., (1983). Đột biến này được sử dụng để tạo ra sự đột biến kép *Hor2- lys3a* như đã được mô tả trước đây bởi Tanner et al. (2010), biểu hiện mức giảm mạnh của hordein toàn phần.

Chỉ thị phân tử được thiết kế và kiểm tra để phát hiện locus *Hor2* kiểu dại và phân biệt nó với locus đã loại bỏ *Hor2*, như sau bằng cách sử dụng các điều kiện PCR chuẩn. Sự vắng mặt của dải PCR B1-hordein có chiều dài 800bp đã phát hiện sự không có mặt (khuyết đoạn) của locus *Hor2* nghĩa là có mặt alen đột biến ở *Hor2*. Cặp mồi được sử dụng trong quá trình khuếch đại là:

3' B1 Hor TCGCAGGATCCTGTACAACG (SEQ ID NO: 68)

5'B1 Hor CAACAATGAAGACCTTCCTC (SEQ ID NO: 69)

Phản ứng PCR đối chứng tạo ra dải PCR đặc trưng có chiều dài 450bp cũng được thực hiện trên mỗi mẫu ADN, cho biết sự có mặt của locus gama-hordein và đảm bảo chất lượng của mẫu ADN đủ cho phản ứng *Hor2*, bằng cách sử dụng các cặp mồi:

5' gama Hor 3 CGAGAAGGTACCATTACTCCAG (SEQ ID NO: 70)

3' gama 3 đầy đủ AGTAACAATGAAGGTCCATCG (SEQ ID NO: 71)

Ví dụ 7

Tạo đột biến lúa mạch không chứa ba hordein

Các cây F5 của lúa mạch dòng đột biến kép *Hor2-lys3a* được xác định là G1*

trong WO2009/021285 được trồng trong nhà kính để tạo ra thế hệ con F6. Sau đó, các cây F6 được trồng trong đồng ruộng để tạo ra thế hệ con F7. Để kết hợp các thể đột biến *Hor2-lys3* với thể đột biến không chứa *Hor3*, cây của thế hệ F7 được lai với cây BC₂ không tạo ra D-hordein có nguồn gốc từ Ethiopia R118 (Ví dụ 5) và thế hệ con F1 được tự phối để tạo ra hạt F2. Hạt F2 được cắt ra một nửa và nửa chứa phôi được gieo mầm và cây giống được sàng lọc bằng phản ứng PCR B- và D-hordein như trong các ví dụ 5 và 6 và đối với gama-hordein. Nửa còn lại của mỗi hạt chứa nội nhũ được trồng trong dung dịch chứa ure 8M, DTT 1% và protein chiết tách được tách bằng phương pháp SDS- PAGE. Sự vắng mặt của các dải protein đặc trưng ở khoảng 50kDa cho biết sự vắng mặt của protein C-hor. Ba dòng không chứa ba hordein, được ký hiệu là T1, T2, và T3 được xác định từ khoảng 300 hạt F2. Tần suất kỳ vọng đối với sự phối hợp của ba thể đột biến lặn, mỗi thể ở trạng thái đồng hợp tử, bởi phương pháp di truyền Mendel (Mendelian genetics) là 1/64, giả định rằng các locus *Hor2* (B-hordein) và *Hor3* (D-hordein) được tách đủ xa trên nhiễm sắc thể 1H để sẵn sàng tái tổ hợp.

Ba cây đồng hợp tử về mỗi thể đột biến trong số ba thể đột biến (*Hor2-lys3a-Hor2*) được ký hiệu là T1, T2 và T3 được duy trì và lan truyền qua ba thế hệ hạt riêng rẽ, lựa chọn 12 hạt nặng nhất trong mỗi thế hệ. Trọng lượng trung bình hạt của hạt F3 từ các dòng này là: T1, 38,2mg; T2, 37,0mg; T3, 39mg. Hiệu suất hạt mỗi dòng (gam hạt mỗi 20 bông) và chiều cao cây được đo. Cây sinh ra bông thừa hạt được loại bỏ. Hai dòng F4 được chọn: T2-4-8 và T2-6-A5 và được thử nghiệm tiếp trong đồng ruộng. Trong số chúng, dòng T2-4-8 được lựa chọn vì có năng suất hạt lớn hơn một chút và được ký hiệu là lúa mạch ULG3.0.

Kiểu hình quan trọng đối với hạt lúa mạch, liên quan đến kích thước và hình dạng của hạt và là chỉ số của năng suất hạt, là phần trăm của hạt không đi qua rây có kích thước mắt lưới 2,8, 2,5, 2,2 và 2,0mm, cụ thể là rây 2,8mm. Hạt nhỏ hơn làm cho quá trình xử lý và mạch nha hóa không hiệu quả so với lúa mạch kiểu đại. Kiểu hình này được gọi là “sàng lọc 2,8mm” và được thể hiện dưới dạng phần trăm hạt không đi qua rây cụ thể. Đối với cây trồng kiểu đại như Sloop, thông số sàng lọc 2,8mm thường bằng 95-98%. Đối với dòng thiếu hụt hordein như thể đột biến kép (ULG2.0), thông số sàng lọc 2,8mm thường bằng khoảng 53%. Đôi khi, phụ thuộc vào các điều kiện phát triển, ví dụ độ khô, thông số này nhỏ hơn khoảng 10% và phần lớn hạt có thể đi qua sàng 2,5mm. Đối với ULG3.0, thông số sàng lọc 2,8mm bằng khoảng 54%. Trọng

lượng trung bình (mg) của hạt thu hoạch được trên ruộng là: Sloop: 53,6+/-0,9, ULG2.0: 33,5+/-0,4; ULG3.0: 39,1+/-0,3. Do đó, ULG3.0 tạo ra năng suất hạt 69% so với ULG2.0 ở mức 50% so với Sloop kiểu đại (100%). Do đó, ULG3.0 thể hiện mức tăng năng suất hạt đáng kể so với dòng ULG2.0. Tuy nhiên, thông số sàng lọc 2,8mm vẫn còn là một vấn đề đối với lúa mạch ULG3.0.

Ví dụ 8

Tạo đột biến lúa mạch không chứa ba hordein khác có năng suất hạt tăng

Mặc dù dòng lúa mạch ULG3.0 tạo ra năng suất hạt tăng so với so với ULG2.0, vẫn cần tăng hơn nữa năng suất hạt. Do đó, cây thuộc dòng ULG3.0 được lai với cây thuộc giống lúa mạch kiểu đại Sloop, Baudin và Yagan, và với cây của dòng hordein không chứa ba hordein đã được nhận biết chứa 50% chất mầm nguyên sinh mẹ mỗi dòng. Dòng không chứa ba hordein được lai chéo, và cũng được lai với cây Hindmarsh và Commander kiểu đại. Thế hệ con chứa cả ba đột biến vô hiệu được lai ngược hai lần với cây các dòng Sloop, Baudin, Hindmarsh và Commander và các dòng có nhiều đồng hợp tử hơn được sinh ra bởi nguồn hạt riêng rẽ. Một trong số nhiều dòng tạo ra được chọn và ký hiệu là lúa mạch ULG3.1.

Từ phép lai chéo với cây Sloop, Yagan và Baudin, lần lai thứ hai được thực hiện để phối hợp dòng của cả ba cây trồng mẹ bắt đầu với cây mà mỗi cây chứa các đột biến không chứa ba hordein. Từ cây F1 được lai chéo, mọi thế hệ con được kỳ vọng là bao gồm cả ba đột biến. Khoảng 1000 hạt F2 mỗi giống được trồng theo hàng trong ruộng, và cây F2 được chọn trong đó cây này tương đối thấp và tạo ra hạt F3 lớn hơn, với bông dày hạt. Cả cây trưởng thành sớm và muộng đều được chọn. Trong thế hệ dưới đây được trồng trên ruộng, các dòng được chọn còn biểu hiện thêm amylaza trong hạt có hàm lượng tương đối cao, chỉ số thu hoạch và độ dài bông tương đối lớn, chiều cao tối ưu (bán lùn), không có lodging và không kháng bệnh phấn trắng. Từ 1500 họ, khoảng 20 họ tốt nhất được chọn. Số liệu của 20 dòng tốt nhất được thể hiện trong Bảng 5. Trọng lượng hạt riêng rẽ (trọng lượng nhân) được cải thiện theo hướng: ULG 3.0: 41,8mg/hạt với trọng lượng hạt cao nhất là 48,4mg/hạt quan sát được đối với dòng P12072-2. Sự cải thiện về kích thước hạt đi kèm với chỉ số thu hoạch gia tăng, phép đo khả năng tạo hạt, trên 40% có chỉ số thu hoạch cao nhất bằng 46,5% được đo ở dòng P12124-1. Quan trọng nhất là phần trăm sàng lọc 2,8mm cũng tăng từ 53,5% đối với ULG3.0 đến trên 80% với mức cao 97,3% đối với dòng P12140-1.

Một dòng chọn lọc được quy định bởi sự tạo hạt riêng rẽ để tạo ra cây đồng hợp tử về ba alen vô hiệu ở *Hor2-lys3a-Hor3* và được ký hiệu là ULG3.2. Thông số sàng lọc 2,8mm đối với ULG3.2 có giá trị nằm trong khoảng từ 80 đến 93% trong một số bản sao khi được trồng trong ruộng so với 97% của Sloop, 85% của Hindmarsh, 96% của cây Oxford kiểu đại, và 98% của Maratime.

Trọng lượng và độ dày trung bình của hạt là: ULG2.0: 33,4mg, 2,4mm; ULG3.0: 41,8mg, 2,5mm; ULG3.2: 47,2mg, 2,8mm.

Bảng 5. Việc chọn lọc thứ hai của dòng ULG 3.2 6.2012

Số ID của cây	Số nhánh gốc trung bình	Chiều dài bông trung bình (cm)	Chỉ số thu hoạch	Không có nhánh gốc	Trọng lượng nhân	% sàng lọc 2,8mm
P12072-2	84,7	8,3	39,0%	9	48,4	88,3
P12132-1	83,0	8,2	43,9%	5	47,5	92,7
P12048-1	75,0	7,0	39,4%	8	47,2	86,7
P12122-2	74,3	6,7	35,0%	5	47,2	96,5
P12049-1	70,0	6,3	38,7%	12	46,5	93,6
P12125-1	78,0	7,7	42,0%	10	46,2	95,3
P12140-1	105,7	9,0	32,4%	15	45,9	97,3
P12055-2	57,0	5,8	36,3%	5	45,7	91,9
P12088-2	72,7	6,3	42,6%	8	45,4	90,7
P12125-2	71,7	5,3	45,3%	8	45,0	95,0
P12043-2	86,7	9,0	29,5%	12	44,7	85,4
P12050-1	64,3	6,0	36,5%	4	44,4	93,6
P12148-1	93,3	7,3	35,0%	14	44,2	90,0
P12149-1	103,3	8,0	34,7%	15	44,0	91,2
P12124-1	79,3	7,3	46,5%	8	43,7	96,8
P12152-2	98,3	9,0	34,8%	9	43,5	91,5
P12049-3	76,3	6,3	40,0%	7	43,2	92,4
P12100-2	79,3	6,3	46,5%	15	43,2	88,3
P12126-1	73,0	6,0	37,0%	10	43,1	98,0
P12122-1	64,7	6,0	45,4%	5	42,8	90,8
P12048-2	65,0	5,7	41,8%	4	42,5	93,9
P12148-2	90,3	6,3	33,3%	7	42,5	94,9
P12159-2	82,7	7,7	33,6%	12	42,4	83,5
P12139-1	113,7	8,3	33,9%	8	42,2	88,1
P12159-1	96,3	8,8	31,9%	14	41,7	94,1
P12139-2	89,3	7,7	34,4%	5	41,3	96,8

Số ID của cây	Số nhánh gốc trung bình	Chiều dài bông trung bình (cm)	Chỉ số thu hoạch	Không có nhánh gốc	Trọng lượng nhân	% sàng lọc 2,8mm
P12064-2	82,3	7,2	40,8%	11	41,2	92,4
P12120-2	75,0	6,8	39,6%	18	41,0	84,0
Tiêu chuẩn lựa chọn		>4 <10	>35%	5 > 20	> 40	>80%

Ví dụ 9

Đo hàm lượng hordein trong thể đột biến lúa mạch không chứa ba hordein

Xác định hàm lượng hordein của bột ULG3.0 bằng phổ phối theo dõi đa phản ứng (MRM MS: Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry)

Để đo hàm lượng hordein một cách chính xác, thử nghiệm MRM MS được sử dụng như sau. Hạt hoặc nửa hạt được xay để tạo ra bột dưới dạng bột nguyên cám, có thành phần tương tự như toàn bộ hạt. Polypeptit prolamin từ 20mg mẫu bột được chiết bằng cách sử dụng 200µl dung dịch bao gồm isopropanol 55% (thể tích) và dithiothreitol (DTT) 2% (trọng lượng/thể tích). Phần phân ước của dịch chiết, tương đương với 5mg bột, được tạo đệm bằng ure 8M trong Tris-HCl 0,1M, pH=8,5, bằng cách ly tâm ba lần, bằng cách sử dụng bộ lọc cắt trọng lượng phân tử 10kDa. Xystein trong polypeptit được alkyl hóa bằng cách bổ sung 100µl iodoacetamid 50mM và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Dung dịch đệm được chuyển thành 100µl amoni bicarbonat 50mM, pH=8,5, và polypeptit được cắt bằng 10µl (20µg) trypsin trong 18 giờ ở 37°C. Peptit được thu hồi bằng cách lọc qua bộ lọc 10kDa, làm khô và hoàn nguyên trong 30µl of 1% (thể tích) axit formic. Peptit được tách bằng phương pháp sắc ký lỏng trên thiết bị Shimadzu Nexera HPLC, sử dụng cột Phenomenex (Kinetex, 1,7µm, C18, 100 x 2,1mm) có gradien từ 5% B đến 40% B trong 10 phút ở tốc độ dòng 0,4ml/phút. Dung môi A là dung dịch axit formic 0,1% (thể tích) trong nước, dung môi B là axetonitril 90% (thể tích) chứa 0,1% (thể tích) axit formic. Nước giải hấp HPLC được đưa trực tiếp vào phổ kế khối lượng và phép phân tích MRM được thực hiện trên phổ kế khối lượng 4000 QTRAP có đích peptit trypsin có nguồn gốc hordein. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm v1.5 và phần mềm MultiQuant v2.0.2 (tích phân diện tích đỉnh).

Fig.5 thể hiện số liệu thu được từ B-hordein, C-hordein, D-hordein, gama- 3-hordein (G3) và gama-1-hordein (G1) đã chọn. Fig.5 thể hiện diện tích đỉnh trung bình đối với mỗi phép chuyển tiếp MRM peptit được bình thường hóa đến hàm lượng có

trong Sloop (100%), đối với bốn lần tiêm lặp lại từ mỗi nửa hạt thu được từ lúa mạch đối chứng (kiểu đại, cv Sloop), dòng không chứa một hordein: Risø 56, Risø 1508 và dòng không chứa D-hordein được tạo ra từ Ethiopia R118, dòng ULG2.0 không chứa hai hordein và dòng T2-4-8 và T2-6-A5 không chứa hai hordein (vòng tròn).

Một peptit đầu tiên được chọn để mô tả mỗi họ hordein, đó là: đối với B- hordein: TLPTMCSNVNPLYR (SEQ ID NO: 48); đối với D-hordein: DVSPECRPVALSQVVR (SEQ ID NO: 49); đối với C-hordein:

LPQKFPVQQPF (SEQ ID NO: 50); đối với G3-hordein; QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID NO: 50) và đối với G1-hordein: CTAIDSIVHAIFMQQGR (SEQ ID NO: 51). Các peptit này xuất hiện thường xuyên và ở mức dư thừa tương đối cao ở lúa mạch kiểu đại, và được chọn dựa trên cơ sở này.

Đã nhận thấy rằng hạt ULG3.0 không chứa ba hordein thu được từ dòng T2-4-8 và dòng T2-6-A5 không chứa ba hordein thứ hai không có hàm lượng có thể phát hiện được của B-, C-, D-, hoặc, ngạc nhiên nhất là, gama-1-hordein. Đó là, dưới 1% hàm lượng được quan sát liên quan đến kiểu đại. Theo cách tương tự, gama-2-hordein không được phát hiện trong hạt ULG3.0. Gama-3-hordein (vòng tròn) có mặt với hàm lượng tương đối thấp khoảng 20% so với hàm lượng của G3 trong Sloop. Gama-3 hordein là hordein có mặt với hàm lượng thấp; hàm lượng gama-3 hordein của Sloop thấp hơn nhiều 1% của tổng hàm lượng hordein. Hạt không chứa một hordein và không chứa hai hordein không tích lũy hordein thích hợp, ví dụ Risø56 và ULG2.0 không tích lũy B-hordein như mong muốn, và Risø1508 và ULG2.0 không tích lũy C-hordein như mong muốn. Hạt Không chứa D-hordein biểu hiện hàm lượng kiểu đại của B- và C-hordein nhưng không tích lũy D-hordein.

Khi phép phân tích được lặp lại bằng cách sử dụng một vài trình tự peptit khác, cụ thể là peptit D-hordein AQQLAAQLPAMCR (SEQ ID NO: 85) có mặt trong protein D-hordein kiểu đại hướng về đầu cuối C, ngay sau vị trí của codon kết thúc trong thể đột biến B-hordein, nhận được các kết quả tương tự (Fig.6). Protein A kiểu avenin cũng không có mặt trong bột.

Rõ ràng rằng hạt thu được từ dòng hordein không chứa ba hordein T2-4-8 và T2-6-A5 không chứa hàm lượng có thể phát hiện được của B-, C-, D-hordein và gama-1 hordein (P17990) và gama-2 đã chọn. Việc quan sát thấy gama-1 hordein và gama-2 là không mong đợi nhất đối với các tác giả sáng chế, vì các dòng đột biến không chứa ba

hordein không được biết đến là có chứa đột biến bất kỳ mà có thể làm bất hoạt hoàn toàn gen tương ứng.

Hượng hordein thấp của hạt ULG3.0 như được xác định bằng MRM đượ xác nhận bằng phương pháp điện di gel hai chiều như sau. 50µg protein tan trong rượu từ dịch chiết của bột từ mỗi dòng hordein null T2-4-8 và T2-6-A5 cũng như lúa mạch đối chứng cv Risø 56, mỗi hỗn hợp được pha thêm 1µg chuẩn polypeptit mốc BSA, chất ức chế trypsin đầu nành và myoglobin ngựa được nhuộm bằng Coomassie G250 dạng keo 0,006% (trọng lượng/thể tích) theo Tanner *et al.* (2013) và so với protein chuẩn 20, 30, 40, 50, 60, 80, và kDa (M; Benchmark Protein Ladder, Invitrogen). Các vết được cắt ra khỏi gel 2D và các protein sau từ Risø 56 đối chứng được xác định bằng phương pháp phổ khối peptit tripsin: C-hordein, gama-2-hordein ($\gamma 2$), gama-3-hordein ($\gamma 3$) và gama-1-hordein ($\gamma 1$), vị trí phỏng đoán của gama-1-, gama-2, và gama-3-hordein trong gel từ hạt ULG3.0 được xác định bằng cách so sánh với gel Risø 56. Chỉ gama-3-hordein được quan sát thấy ở bột ULG3.0, ba polypeptit khác không phát hiện được. Nồng độ gama-3 hordein của mỗi vết được đo bằng ba phương pháp: 1) Dưới dạng phần trăm của tất cả các thể tích vết từ 50µg protein: hàm lượng trung bình của $\gamma 3$ trong ULG3.0 bằng $13,5 \pm 1,6$ ppm; 2) Liên quan đến cường độ vết của 1µg BSA: hàm lượng $\gamma 3$ trung bình trong ULG3.0 là $10,9 \pm 1,3$ ppm; 3) tương đối với thể tích vết (cường độ x diện tích) của 1µg BSA: hàm lượng $\gamma 3$ trung bình của ULG3.0 là $3,4 \pm 0,4$ 1ppm.

Hàm lượng hordein thấp trong hạt ULG3.0 như được xác định bằng MRM được xác nhận tiếp bằng phương pháp ELISA như sau. 20mg mẫu bột nguyên cám hoặc nửa hạt chứa nội nhũ được nghiền và rửa ba lần trong 0,5ml nước MilliQ bằng cách lắc ở tốc độ 30/giây trong 3 x 30giây trong máy nghiền rung 96 lỗ (Retsch GmbH, Rheinische) và ly tâm ở tốc độ 14000 vòng/phút trong 5 phút. Prolamin trong bột được chiết tách vào dung dịch rượu chứa 0,5ml isopropanol 50% (thể tích)/DTT 1% (trọng lượng/thể tích), đối với các dòng đối chứng Sloop, Risø56, Risø1508, và đối với ULG2.0, dòng không chứa ba hordein T1, T2, và T3, và thể hệ con truyền từ hạt riêng rẽ từ T2-4-8 và T2-6-A5. Nồng độ protein được xác định theo Bradford (1976) và 40ng (1900ng đối với hạt không chứa ba hordein) protein tan trong rượu được pha loãng bằng dung dịch chứa chất làm loãng hệ ELISA với lượng dư không đổi của H_2O_2 0,2mM được thêm vào để tiêu DTT bất kỳ còn lại từ phần chiết ban đầu. Dung dịch protein đã được làm loãng được cho vào các lỗ trên đĩa ELISA

(ELISASystem, Windsor, Queensland, AUSTRALIA), rửa và phát triển ở 37°C trong 15 phút theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Lượng hordein trong dịch chiết đối chứng được làm cân bằng với chuẩn 0-50ng của toàn bộ hordein trong Sloop. Hàm lượng hordein của triple- null được làm cân bằng với chuẩn 0-5ng của toàn bộ hordein trong ULG2.0. Hordein trong Sloop và ULG2.0 được chuẩn bị như được mô tả bởi Tanner et al. (2010).

Bằng phương pháp ELISA, tổng hàm lượng hordein của mẫu bột double- null là 2,9% tương đối với cv Sloop kiểu đại, trong đó hàm lượng hordein còn lại của hai dòng không chứa ba hordein đã chọn, T2-4-8 và T2-6-A5 là 3,9 và 1,5ug/g (phần triệu, ppm; Bảng 6) cả hai đều thấp hơn đáng kể mức FSANZ hợp lệ là 20ppm đối với gluten trong thực phẩm không chứa gluten và thấp hơn khoảng 15000 lần trong hạt cv Sloop kiểu đại.

Xác định hàm lượng hordein của bia ULG3.0 bằng phổ khối MRM

Hàm lượng hordein của bia được nấu từ hạt lúa mạch ULG3.0 được đo bằng phương pháp MRM MS, phát hiện các trình tự peptit đặc hiệu, bằng cách sử dụng phương pháp như được mô tả trong các ví dụ 3 và 4 có một vài thay đổi. Số liệu được thể hiện trên Fig.7. Thử nghiệm cho thấy không có protein A kiểu avenin, B1- và B3-hordein, D-hordein và hàm lượng gama-1-hordein và gama-3-hordein đều giảm, trong đó không phát hiện nhiều nền trong phổ khối (Fig.7). Thử nghiệm này cũng cho thấy sự vắng mặt của C-hordein.

Bảng 6. Tóm tắt hàm lượng hordein của các dòng không chứa một, hai và ba hordein

Dòng	mg Hordein/gm bột	% Sloop
Sloop	56,6 ± 3,3	100%
Risø56	33,3 ± 1,1	58,8%
Risø1508	4,9 ± 0,26	8,7%
ULG2.0	1,67 ± 0,07	2,9%
T2-4-8 (ULG3.0)	0,0039 ± 0,0017	0,007%
T2-6-A5	0,0015 ± 0,0004	0,0027%

Xác định hàm lượng hordein của bột ULG3.1 và ULG3.2 bằng phương pháp MRM MS

Hàm lượng hordein của bột xay từ hạt thu được từ các dòng ULG3.1 và 10 dòng

cạnh tranh đối với ULG3.2 được xác định bằng phương pháp MRM MS như được mô tả đối với hạt ULG3.0. Nửa hạt được xay thành bột và protein prolamin từ 20mg bột (n = 4 bản sao) được chiết tách, alkyl hóa, cắt trypsin và phân tích bằng phương pháp MRM MS như được mô tả trên đây. Số liệu được vẽ trên Fig.8, thể hiện diện tích đỉnh trung bình đối với mỗi peptit (tổng của ba chuyển tiếp MRM) từ mỗi nửa hạt của ULG3.1 và các dòng xuất phát từ các dòng lai cha mẹ kép ký hiệu là 043-2 – 148-2. Chúng được vẽ so sánh với lúa mạch đối chứng (cây trồng Sloop, Baudin, Commander và Hindmarsh kiểu đại) và dòng không chứa ba hordein T2-4-8. Diện tích đỉnh được thể hiện đối với peptit đầu tiên được chọn, đại diện của mỗi họ hordein, Số đăng ký Uniprot và trình tự axit amin là như sau:

A-F2EGD5_QQCCQPLAQISEQAR (SEQ ID NO: 52; từ F2EGD5, ở giữa protein A kiểu avenin)

B1-Q40020_VFLQQQCSPVR (SEQ ID NO: 53; gần với đầu tận cùng N của B1-hordein)

B3-Q4G3S1_VFLQQQCSPVPMPQR (SEQ ID NO: 54)

C-Q40055_QLNPSHQELQSPQQPFLK (SEQ ID NO: 55; gần với đầu tận cùng N của C-hordein)

D-Q84LE9_ELQESSLEACR (SEQ ID NO: 56; từ Q84LE9, trước codon kết thúc ở Y150)

G1-P17990_APFVGVVTGVGGQ (SEQ ID NO: 57; từ P17990, peptit đầu tận cùng C), và

G3-P80198_QQCCQQLANINEQSR (SEQ ID NO: 58; từ P80198, ở giữa γ 3-hordein).

Hàm lượng D-hordein trong hạt lai chéo hai cha mẹ thể hiện trên Fig.8 là tương tự với hàm lượng D-hordein trong hạt thu được từ ULG2.0 và dòng hordein không chứa ba hordein T2-4-8 và T2-6-A5, gần bằng 0, xác nhận sự quan sát bởi 2D PAGE rằng D-hordein không được phát hiện trong hạt từ dòng T2-4-8 và T2-6-A5. Hàm lượng của gama-1-hordein trong các hạt lai chéo hai cha mẹ này cũng tương tự với hàm lượng của gama-1-hordein trong ULG2.0 và dòng hordein không chứa ba hordein T2-4-8 và T2-6-A5. Một số dòng ULG3.2 có mức hàm lượng peptit APFVGVVTGVGGQ (SEQ ID NO: 59) gần bằng 0. Gama-1-hordein không được phát hiện bởi 2D PAGE trong dòng T2-4-8 và T2-6-A5. Hàm lượng gama-3-hordein trong hạt lai chéo hai cha mẹ cũng

tương tự với hàm lượng của γ -3-hordein trong ULG2.0 và các dòng hordein không chứa ba hordein ngoại trừ đối với dòng 124,1 (ULG3.2) trong đó hàm lượng này là rất thấp. γ -3-hordein cũng được phát hiện ở hàm lượng giảm bởi 2D PAGE trong dòng T2-4-8 và T2-6-A5.

Thứ vị là, tác dụng hiệp đồng được nhận thấy trong các đột biến *Hor2* và *lys3a* có hàm lượng D-hordein giảm trong ULG2.0 ngược lại không xảy ra đối với đột biến *Hor3* (D-hordein). Theo cách tương tự, sự có mặt của cả ba đột biến (*Hor2-lys3a-Hor3*) có tác dụng hiệp đồng khi giảm sự tích tụ của γ -1- và γ -2-hordein như được xác định bằng peptit nêu trên.

Ví dụ 10

Tạo các thể đột biến lúa mạch không vỏ không chứa ba hordein

Hạt lúa mạch để lựa chọn ULG3.0, ULG3.1 và ULG3.2 đều có vỏ trấu, có lợi cho ngành công nghiệp rượu bia dưới dạng vỏ trấu khô đã dùng rồi tạo ra đệm lọc trong các giai đoạn cuối cùng của bước lọc hèm rượu (lọc). Tuy nhiên, vỏ hạt lúa mạch có một số lượng lớn các mảnh nhọn silic dioxit nhỏ và do đó vỏ trấu cần được loại bỏ bằng cách xay nhỏ trước khi sử dụng. Một phương pháp khác là để tạo ra hạt không vỏ bằng các phương pháp di truyền. Do đó, cây ULG3.0 được lai với các cây của giống lúa mạch không vỏ được ký hiệu là Barleymax II (WO2011/011833) và thể đột biến không vỏ, B-, C-, D-hordein không chứa ba hordein (*Hor2-lys3a-Hor3*) đã chọn mà là kiểu đại về gen *SSIa*.

Một số chọn lọc F6 không chứa ba hordein không vỏ (ví dụ A7_1) chứa dưới hordein với lượng tổng cộng bằng nhỏ hơn 0,1ppm trong bột sau khi ba lần làm giảm hạt đơn.

Ví dụ 11

Gây đột biến lúa mạch

Để phân lập các thể biến dị trong các gen đã chọn ở lúa mạch, việc gây đột biến bằng phetylmetansulfonat (EMS) được thực hiện như được mô tả bởi Caldwell (2004). Theo cách khác, 45000 (1,5kg) hạt ULG3.0 được gây đột biến như sau: hạt được ngâm trong 2,5l nước cất trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện thoáng khí. Nước được thay mỗi giờ trong quá trình ngâm. Sau đó, hạt được ủ trong 2,5l EMS 30mM vừa được điều chế trong dung dịch đệm phosphat 0,1M (pH=7) trong 16 giờ ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện thoáng khí. Sau đó, hạt được rửa bằng

2,5l dung dịch natri thiosulfat 100mM trong 10 phút ở nhiệt độ trong phòng. Việc rửa bằng thiosulfat được lặp lại, và sau đó hạt được rửa kỹ bằng 2 x 2l nước cất trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng trong điều kiện thoáng khí. Hạt được làm khô trong không khí qua đêm trên giấy lọc thấm hút trong dòng không khí di chuyển, trước khi trồng trên ruộng vào ngày hôm sau. Một lượng lớn hạt M2 được thu hoạch, gộp lại và phân tích thể đột biến. Tần suất đột biến sau việc xử lý như vậy khoảng 1 thể đột biến trong gen đang quan tâm mỗi 1000 hạt. Hạt được sàng lọc sự thiếu biểu hiện của gama-3 hordein bằng kỹ thuật lai điểm (dot blot) trên nửa hạt bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng đặc hiệu gama-3 hordein, và 40 hạt tạo ra tín hiệu âm được xác định từ vài chục nghìn hạt M2. Việc thiếu gama-3 hordein trong các hạt này được xác nhận bằng phép tách Western bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng, và bằng phổ kế khối lượng đối với peptit đặc hiệu (SEQ ID NO:58). Nửa hạt chứa phôi từ mỗi hạt âm tính được đặt trong môi trường để cho phép nảy mầm. Phôi trong hầu hết nửa hạt không nảy mầm nhưng vài hạt lại nảy mầm.

Ví dụ 12

Tạo bia từ lúa mạch có hàm lượng hordein thấp

Các thử nghiệm nấu bia được thực hiện bằng cách sử dụng mạch nha được tạo ra từ hạt ULG2.0 bằng các phương pháp chuẩn, và so sánh với lúa mạch đối chứng kiểu đại cv. Gairdner. Gairdner là giống lúa mạch bán lùn 2- row chín từ sớm đến muộn có hiệu suất cao mọc rộng rãi khắp các vùng trồng ngũ cốc ở Australia. Giống lúa mạch này tạo ra kích thước hạt tốt trong các điều kiện thuận lợi, tạo ra mức chiết, khả năng lên men và cường độ men diastaza trung bình, và do đó là “tiêu chuẩn” công nghiệp nên là lý tưởng để được sử dụng làm đối chứng trong các thử nghiệm đánh giá quy trình nấu bia. Mạch nha được tạo ra từ ULG2.0 có hàm lượng ẩm bằng 5,7% cao hơn một chút so với mạch nha Gairdner (5,0%) và hình thức khác biệt đáng kể với mạch nha Gairdner, trong đó hạt dường như có vết lõm và khô. Cường độ men diastaza (DP: Diastatic Power) của mạch nha ULG2.0 là 54WK, thấp hơn nhiều so với DP của Gairdner ở 299WK. Lúa mạch đã được mạch nha hóa thường có DP bằng ít nhất 250KW. Tuy nhiên, mạch nha ULG2.0 là âm tính đối với tinh bột sau thời gian ngâm 20 phút và đạt được kết quả LG bằng 1,7° Plato.

Mạch nha được xay bằng hai lần đi máy xay 2 trục lần và đạt được độ nứt hạt hợp lý. Mạch nha sẽ phù hợp nhất đối với việc xay phức tạp hơn trong máy xay 6 trục lần

do hình thái học hạt của nó. Theo cách khác, máy xay kiểu búa phối hợp với máy lọc khối nghiền có thể được sử dụng, hơn là thùng lọc dịch quả để tách hèm rượu. Sản phẩm đã xay được nghiền bằng các phương pháp chuẩn ở nhiệt độ ban đầu bằng 65°C trong 20 phút, sau đó 74°C trong 5 phút, cùng với việc bổ sung dung dịch rây dư. Nói chung, hình thái học khô của mạch nha ULG2.0 làm cho nó khó xay và nghiền một cách thỏa đáng so với mạch nha thông thường. Sau đó, sản phẩm đã được nghiền được lọc dịch quả, tại đó lần nữa hình thái học khô của ULG2.0 lại gây khó khăn. Đệm lọc dịch quả rời ra cùng với trong quá trình nên dòng chảy ra cần phải dừng lại và đệm lọc dịch quả được cào lại. Một lượng dịch chiết tiềm năng đáng kể bị mất đi trong quá trình lọc dịch quả do quá trình xay không có hiệu quả, đạt được toàn bộ trong nồi đun giá trị bằng 10,96° và 11,12° Plato trong khi mục đích là đạt được 14° Plato. Độ pH, màu EBC và mức beta-glucan là chấp nhận được. Nhược điểm của quá trình xay cũng có nghĩa là không hình thành hiệu quả đệm trấu để có tác dụng như là môi trường lọc, làm giảm lượng dịch chiết mong muốn. Độ trong của dòng chảy ra ban đầu rất mờ, do sự hình thành đệm lọc kém, mặc dù độ trong của hèm rượu được cải thiện ở mức chấp nhận được khi dòng chảy ra đạt 30l.

Hèm rượu tạo ra được lên men bằng chủng nấm men *Saccharomyces uvarum* A ở 18,5°C trong 120 giờ. Profil lên men là bình thường, không có pha kết tủa phát triển ở giai đoạn bắt đầu lên men, mặc dù diacetyl với hàm lượng đáng kể còn lại ngay cả sau khi pha nghỉ diacetyl khai triển được tạo ra sau khi kết thúc sự lên men. Pha nghỉ diacetyl là pha mà tại đó bia được để ở nhiệt độ lên men cao hơn trước khi làm lạnh bia đến 0°C để cho phép nấm men tái hấp thu và chuyển hóa diacetyl. Thông thường, 24 giờ ở cuối quá trình lên men là thời gian cần thiết để cho phép nấm men để phá vỡ sản phẩm này. Điều này không xảy ra với cả hai quá trình nấu bia thử nghiệm trên ULG2.0. Dịch chiết hoa bia đồng phân hóa được thêm vào ở hàm lượng 30mg/l và nước cái được làm trong bằng cách bổ sung Silica Hydrogel. Bia sáng màu thành phẩm có độ ổn định vật lý thấp hơn mẻ bia đối chứng. Sự mờ đục trong quá trình làm lạnh ban đầu được cho là cao và sự mờ đục trong quá trình làm lạnh cưỡng bức là nằm ngoài sự mô tả bình thường. Tuy nhiên, sự mờ đục trong quá trình làm lạnh không tạo ra hạt.

Bia thành phẩm được phân tích nhận cảm bởi một bản đánh giá của người nấu bia đã qua đào tạo, và mặc dù có khác khó khăn trong qua trình xay và lọc dịch quả, nhưng ngạc nhiên là nhận được các kết quả tốt liên quan đến quá trình nấu bia từ mạch nha.

DMS (dimetyl sulfua) là hương vị chiếm ưu thế; tuy nhiên điều này không được nhìn nhận là vấn đề khó chịu. Sự có mặt của DMS thường được cho là lỗi hương vị ở bia của Úc nhưng thường được chấp nhận ở châu Âu, cụ thể là bia Đức. Nhận xét của người nấu bia là bia ULG2.0 không quá khác với bia đối chứng và bia này là một loại bia rất tốt, và gợi nhớ đến bia Đức. Bia tạo ra không có hương vị kiểu “hạt” hoặc “ngũ cốc” và không bị chát với bia ULG2.0 như thường nhận thấy ở bia thương mại được bán trên thị trường với ghi chú “Không chứa gluten”. Toàn bộ profil hương vị là chấp nhận được và hợp lý.

Bia được sản xuất từ hạt lúa mạch ULG3.0 bằng phương pháp tương tự như đối với ULG2.0, và được sản xuất từ hạt lúa mạch ULG3.2. Quá trình mạch nha hóa của hạt ULG3.0 được cải thiện so với hạt ULG3.0, chủ yếu do bước xay được cải thiện do hạt đỡ khô hơn. Bia được sản xuất từ ULG3.0 có chất lượng tốt với hương vị chấp nhận được và hợp lý. Hình thái học của hạt được cải thiện (kích thước và hình dạng) của hạt từ dòng ULG3.2 làm cho bước xay và lọc dịch quả trở nên dễ dàng hơn trong quá trình nấu bia, tạo ra bia có hàm lượng hordein tổng cộng nhỏ hơn 1ppm.

Ví dụ 13

Sản xuất thực phẩm bằng cách sử dụng lúa mạch ULG

Hai ổ bánh mì nhỏ (10g) được nướng bằng cách sử dụng dòng lúa mạch ULG3.0 và ULG3.2. Các ổ bánh mì nhỏ này được nướng cho mục đích thử nghiệm, nhưng phương pháp này có thể dễ dàng được tăng thành các lượng thương mại. Một ổ bánh mì được làm từ 100% bột lúa mạch ULG làm thành phần bột, đã được xay như được mô tả trên đây, trong lúc đó ổ bánh mì thứ hai được làm từ hỗn hợp bột bao gồm 30% bột và 70% bột không gluten được bán trên thị trường như bột gạo làm thành phần bột. Bột (13,02g) và các thành phần khác được trộn thành khối bột nhào để nướng bánh, để đạt thời gian phát triển khối bột nhào đạt tới đỉnh cao nhất ở giá trị 35-g mixograph. Công thức pha chế được sử dụng, dựa trên 13,02g bột trong mỗi trường hợp là: bột 100%, muối 2%, nấm men khô 1,5%, dầu thực vật 2%, và chất phụ gia 1,5%. Lượng nước bổ sung dựa trên giá trị hấp thu nước vi nhánh Z được điều chỉnh cho công thức đầy đủ. Việc tạo khuôn và cho vào khuôn được thực hiện theo các bước nở hai giai đoạn ở 40°C và độ ẩm phòng bằng 85%. Bước nướng được thực hiện trong lò Rotel trong 14 phút ở 190°C.

Bánh mì chứa hàm lượng gluten dưới 20ppm và thích hợp cho người mắc bệnh

CD sử dụng.

Chuyên gia trong lĩnh vực rằng hiểu được rằng có thể thực hiện nhiều thay đổi và/hoặc biến đổi đối với sáng chế như được trình bày trong các phương án cụ thể mà không ra khỏi tinh thần hoặc phạm vi của sáng chế như được mô tả một cách rộng rãi. Các phương án này, do đó, được xem xét trong tất cả các khía cạnh như là sự minh họa và không làm giới hạn sáng chế.

Tất cả các công bố được thảo luận và/hoặc tham khảo ở đây được đưa trọn vẹn vào đây.

Bất kỳ thảo luận về các tài liệu, hành động, nguyên liệu, thiết bị, các bài báo hoặc tương tự mà được bao gồm trong bản mô tả này chỉ duy nhất cho mục đích cung cấp một ngữ cảnh cho sáng chế. Nó không được dùng như một sự thừa nhận rằng bất kỳ hoặc tất cả các vấn đề trong các vấn đề này tạo thành một phần cơ sở ưu tiên trong lĩnh vực hoặc là kiến thức chung thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan đến sáng chế khi nó tồn tại trước ngày ưu tiên của yêu cầu bảo hộ của đơn yêu cầu cấp patent này.

Tài liệu tham khảo

- Abdullah et al. (1986) *Biotechnology* 4:1087.
- Almeida and Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol* 15: 251-258.
- Anderson et al. (2000) *Nature Medicine* 6:337-342.
- Anderson et al. (2013) *Genome* 56:179-185.
- Bibikova et al. (2001) *Mol. Cell. Biol.* 21: 289-287.
- Bibikova et al. (2002) *Genetics* 161:1169-1175.
- Bourque (1995) *Plant Sci.* 105: 125-149.
- Brandt et al. (1990) *Eur J Biochem* 194:499-505.
- Brennan et al. (1998) *J Cereal Sci.* 28:291-299.
- Caldwell (2004) *The Plant Journal* 40:143-150.
- Cameron-Mills et al., (1998). *Plant Mol Biol* 11: 449-461.
- Capecchi (1980) *Cell* 22:479-488.
- Catassi et al. (1994) *Lancet* 343:200-203.
- Certo et al. (2012) *Nat Methods* 8:941-943.
- Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657.
- Clapp (1993) *Clin. Perinatol.* 20:155-168.

- Colgrave et al., (2012) *J. Proteome Res.* 11: 386-396.
- Comai et al. (2004) *Plant J* 37: 778-786.
- Curiel et al. (1992) *Hum. Gen. Ther.* 3:147-154.
- Davies et al. (1993) *Cell Biology International Reports* 17:195–202.
- De Anglis et al. (2007) *J Food Protection* 70:135-144.
- Doll (1983) Barley seed proteins and possibilities for their improvement. In "Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritional Value", Gottschalk W, Muller HP (eds). Martinus Nijhoff, The Hague:207-223.
- Doll et al (1973) *Barley Genetics Newsletter* 3:12-13.
- Dostalek et al. (2006). *Food Additives and Contaminants* 23:1074-1078.
- Doyon et al. (2010) *Nat. Methods* 7:459-460.
- Doyon et al. (2011) *Nat. Methods* 8:74-79.
- Eglitis et al. (1988) *Biotechniques* 6:608-614.
- Fasoli et al., (2010). *J. Proteome Res.* 9: 5262-6269.
- Field et al. (1982) *Theoretical and Applied Genetics* 62:329–336.
- Fowell et al. (2006) *Qjm-an International Journal of Medicine* 99:453-460.
- Fujimura et al. (1985) *Plant Tissue Culture Letters* 2:74.
- Graham et al. (1973) *Virology* 54:536-539.
- Grant et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 15:254-258.
- Green (2009) *Journal of the American Medical Association* 302:1225-1226.
- Green and Jabri (2006) *Annual Review of Medicine* 57:207-221.
- Groenen et al. (1993) *Mol. Microbiol.* 10:1057-1065.
- Gu et al. (2003) *Genome* 46:1084-1097.
- Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 400:96-107
- Haft et al. (2005) *Computational Biology* 1(6):e60
- Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591.
- Hausch et al. (2002) *Gastroenterology* 122:A180.
- Henikoff et al. (2004) *Plant Physiol* 135: 630-636.
- Hoe et al. (1999) *Emerg. Infect. Dis.* 5:254-263.
- Ishino et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169:5429-5433.
- Janssen et al. (2002) *OMICS J. Integ. Biol.* 6:23-33.
- Jaradat (1991) *Theor Appl Genet* 83:164-168.

- Kahlenberg et al. (2006) *European Food Research Technology*. 222:78-82.
- Kasarda et al. (1984) *PNAS* 81:4712-4716.
- Kikuchi et al., (2003). *Theor Appl Genetics* 108: 73-78.
- Kim et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1156-1160
- Kim et al. (2012) *Genome Res.* 22:1327-1333.
- Koziel et al. (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:393-405.
- Kreis and Shewry (1989) *BioEssays* 10:201–207.
- Kreis et al. (1983) *Cell*: 34:161-167.
- Kristoffersen et al., (2000) *Electrophoresis* 21: 3693-3700.
- Kupper (2005) *Gastroenterology* 128:S121-127.
- Lanzini et al. (2009) *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29:1299–1308.
- Lee et al. (2007). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 20:423-430.
- Lu et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:2089-2096.
- Marti et al. (2005) *J Pharmacol Exp Therapeut* 312:19-26.
- Masepohl et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1307:26-30.
- McConnell Smith et al. (2009) *PNAS* 106:5099-5104.
- Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- Miller et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785.
- Mojica et al. (1995) *Mol. Microbiol.* 17:85-93.
- Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.* 36:244-246.
- Moravcova et al. (2009). *Journal of Chromatography a* 1216:3629-3636.
- Nakata et al. (1989) *J. Bacteriol.* 171:3553-3556.
- Ohlund et al. (2010). *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 23:294-300.
- Pasquinelli et al. (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205.
- Perriman et al. (1992) *Gene* 113: 157-163.
- Picariello et al. (2011). *Food Chemistry* 124:1718-1726.
- Ramirez et al. (2012) *Nucleic Acids Res.* 40:5560-5568.
- Rubio-Tapia et al. (2010). *American Journal of Gastroenterology* 105:1412-1420.
- Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15: 79-119.
- Shan et al. (2002). *Science* 297:2275-2279.
- Shewry (1995) *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 70:375-426.

- Shewry and Halford (2002) *Journal of Experimental Botany* 53:947–958.
- Shewry and Tatham (1990) *Biochemical Journal* 267:1-12.
- Shewry, et al., (1999) The prolamins of the Triticeae. In *Seed Proteins*, Klewew: London, 1999; pp 35-78.
- Shippy et al. (1999) *Mol. Biotech.* 12: 117-129.
- Skovbjerg et al. (2005) *Diabetologia* 48:1416-1417.
- Skovbjerg et al., (2004). *Biochim. et Biophys. Acta - Mol. Bas.of Dis.* 1690:220-230.
- Slade and Knauf (2005) *Transgenic Res* 14: 109-115.
- Smith et al. (2000) *Nature* 407: 319-320.
- Stepniak et al. (2006) *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 291:621-629.
- Szczepek et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:786-793.
- Tanner et al. (2013) *Plos One*: 8:e56456.
- Tanner et al., (2010). *Aliment Pharmacol Ther.* 32: 1184-1191.
- Tjon et al. (2010) *Immunogenetics* 62:641-651.
- Toriyama et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 205:34.
- Tye-Din et al. (2010) *Science Translational Medicine* 2:41-51.
- van Embden et al. (2000) *J. Bacteriol.* 182:2393-2401.
- Wagner et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099-6103.
- Wang et al. (2012) *Genome Res.* 22:1316-1326.
- Waterhouse et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964.
- Wijngaard and Arendt (2007) *Brewer & Distiller International* 3: 31-32.
- Wild et al. (2010). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 32:573-581.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất thành phần thực phẩm hoặc thực phẩm, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (i) xử lý hạt lúa mạch chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm để tạo ra bột hoặc bột nguyên cám, và/hoặc (ii) trộn hạt lúa mạch, hoặc bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, với ít nhất một thành phần thực phẩm khác, trong đó hạt lúa mạch, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm, bằng cách đó tạo ra thành phần thực phẩm hoặc thực phẩm.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hạt, bột hoặc bột nguyên cám chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5ppm, nằm trong khoảng từ 0,05ppm đến 50ppm, hoặc từ 0,05ppm đến 20ppm, từ 0,05ppm đến 10ppm, từ 0,05ppm đến 5ppm, từ 0,1 ppm đến 5ppm, khoảng 3,9ppm, hoặc khoảng 1,5ppm.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó trọng lượng trung bình của hạt bằng ít nhất khoảng 35mg, bằng ít nhất khoảng 39mg, bằng ít nhất khoảng 41mg, bằng ít nhất khoảng 47mg, nằm trong khoảng từ 35mg đến 60mg, từ 40mg đến 60mg, từ 45mg đến 60mg, khoảng 39,1mg, khoảng 41,8mg hoặc khoảng 47,2mg.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, nằm trong khoảng từ 80% đến 98%, hoặc từ 80% đến 93%, hạt không đi qua rây có kích thước mắt lưới 2,8mm.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây có chỉ số thu hoạch bằng ít nhất 40%, nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, từ 40% đến 55%, hoặc từ 40% đến 50%.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó hạt có tỷ số độ dài/độ dày nhỏ hơn khoảng 5, nhỏ hơn khoảng 4, nhỏ hơn khoảng 3,8, nằm trong khoảng từ 2 đến 5, hoặc từ 2,5 đến 3,8.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó bột hoặc bột nguyên cám được tạo ra từ hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5ppm, nằm trong khoảng từ 0,05ppm đến 10ppm, hoặc từ 0,05ppm đến 5ppm, khoảng 3,9ppm, hoặc khoảng 1,5ppm.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó hạt, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, có mức kiểu đại nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc không chứa một hoặc nhiều hơn một hoặc toàn bộ các hordein sau:

- i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,
- ii) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,
- iii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
- iv) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56,

trong đó mỗi mức nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2% là so với hạt lúa mạch kiểu đại, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó B-hordein là ít nhất B1-hordein và B3-hordein.

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc điểm 9, trong đó hạt, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, còn có mức kiểu đại nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc không chứa:

i) γ -hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:57, và/hoặc

ii) protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:52,

trong đó mỗi mức nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2% là so với hạt lúa mạch kiểu đại, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó hạt là đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ, hoặc trong đó bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó hạt là đồng hợp tử về alen vô hiệu của gen mã hóa D-hordein tại locus *Hor2*, hoặc trong đó bột

hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen vô hiệu của gen mã hóa D-hordein, alen vô hiệu này tốt hơn là chứa codon kết thúc, đột biến vị trí cắt, đột biến lệch khung đọc, đoạn xen, đoạn khuyết hoặc mã hóa D-hordein đã được cắt ngắn, hoặc, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa D-hordein đã được loại bỏ.

13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó D-hordein đã được cắt ngắn có codon kết thúc nằm ở bộ ba mã hóa axit amin số 150.

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó hạt là đồng hợp tử về alen ở locus *Lys2* của cây lúa mạch sinh ra hạt không chứa C-hordein, hoặc trong đó bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen ở locus *Lys3*.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó hạt, bột hoặc bột nguyên cám chứa hàm lượng hordein nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,01%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,007%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,0027%, nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1%, từ 0,001% đến 0,01%, khoảng 0,007%, hoặc khoảng 0,0027%, so với hạt thu được từ cây lúa mạch kiểu đại tương ứng hoặc bột hoặc bột nguyên cám được tạo ra theo cách tương tự từ hạt thu được từ cây lúa mạch kiểu đại tương ứng.

16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây có hiệu suất hạt bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, từ 60% đến 100%, từ 70% đến 100%, từ 80% đến 100%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, hoặc khoảng 90% hiệu suất hạt của cây lúa mạch kiểu đại.

17. Phương pháp theo điểm 15 hoặc điểm 16, trong đó trọng lượng trung bình của hạt bằng ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc khoảng 100%, trọng lượng hạt của cây lúa mạch kiểu đại.

18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, trong đó hạt, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên, chứa một hoặc nhiều hơn một hoặc toàn bộ các hordein sau với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, hoặc từ 0,1% đến 10%, khi so với cây lúa mạch kiểu đại tương ứng:

i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,

- ii) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,
- iii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
- iv) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó B-hordein là ít nhất B1 và B3.

20. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 19, trong đó hạt, bột hoặc bột nguyên cám tạo ra từ hạt nêu trên còn chứa các protein sau với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, hoặc từ 0,1% đến 10%, khi so với cây lúa mạch kiểu đại tương ứng:

- i) γ -hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:57, và/hoặc
- ii) protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:52.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 20, trong đó cây lúa mạch kiểu đại là Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

22. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 21, trong đó độc tính đối với đường ruột của bột được tạo ra từ hạt là nhỏ hơn khoảng 5%, hoặc nhỏ hơn khoảng 1%, so với độc tính đối với đường ruột của bột được tạo ra từ hạt của cây lúa mạch kiểu đại tương ứng.

23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 22, trong đó trọng lượng hạt trung bình ít nhất cao gấp 1,05 lần, ít nhất 1,1 lần hoặc từ 1,05 đến 1,3 lần hạt:

- i) đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ,
- ii) đồng hợp tử về alen ở locus *Lys3* của cây lúa mạch sinh ra hạt thiếu C-hordein, và
- iii) đồng hợp tử về alen kiểu đại của D-hordein mã hóa protein có chiều dài đầy đủ.

24. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 23, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây có hiệu suất hạt ít nhất gấp 1,20 lần, hoặc ít nhất gấp 1,35 lần, hoặc gấp từ 1,2 đến 1,5 lần, hoặc gấp từ 1,2 đến 2,0 lần so với hạt thu được từ cây:

i) đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ,

ii) đồng hợp tử về alen ở locus *Lys3* của cây lúa mạch sinh ra hạt thiếu C-hordein, và

iii) đồng hợp tử về alen kiểu đại của D hordein mã hóa protein có chiều dài đầy đủ.

25. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 24, trong đó ít nhất khoảng 50% hệ gen của hạt lúa mạch giống với hệ gen của giống lúa mạch Sloop, Hindmarsh, Oxford hoặc Maratime.

26. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây không chuyển gen.

27. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 26, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây chuyển gen.

28. Phương pháp theo điểm 27, trong đó cây chứa gen chuyển mã hóa polynucleotit điều hòa giảm sự tạo ra của ít nhất một hordein trong hạt.

29. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 28 còn bao gồm bước tạo ra bột hoặc bột nguyên cám từ hạt.

30. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 29, trong đó ít nhất khoảng 50% hạt nảy mầm trong 3 ngày sau khi ngâm.

31. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 30, trong đó thành phần thực phẩm là bột hoặc tinh bột, hoặc trong đó thực phẩm là bánh mì có sử dụng bột nổi hoặc không sử dụng bột nổi, mì ống, mì sợi, ngũ cốc ăn sáng, thực phẩm ăn nhẹ, bánh ngọt, bánh nướng hoặc thực phẩm chứa nước sốt trên cơ sở bột.

32. Phương pháp sản xuất thành phần đồ uống trên cơ sở mạch nha hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha, trong đó phương pháp này bao gồm các bước (i) xử lý hạt lúa mạch chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm để tạo ra mạch nha hoặc hèm rượu, và/hoặc (ii) trộn hạt lúa mạch, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên, với ít nhất một thành phần đồ uống khác, trong đó hạt lúa mạch, mạch nha hoặc hèm rượu chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm, bằng cách đó tạo ra thành phần đồ uống trên cơ sở mạch nha hoặc đồ uống trên cơ sở mạch nha.

33. Phương pháp theo điểm 32, trong đó hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 20ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10ppm, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5ppm, nằm trong khoảng từ 0,05ppm đến 50ppm, hoặc từ 0,05ppm đến 20ppm, từ 0,05ppm đến 10ppm, từ 0,05ppm đến 5ppm, từ 0,1 ppm đến 5ppm, khoảng 3,9ppm, hoặc khoảng 1,5ppm.

34. Phương pháp theo điểm 32 hoặc điểm 33, trong đó trọng lượng trung bình của hạt bằng ít nhất khoảng 35mg, bằng ít nhất khoảng 39mg, bằng ít nhất khoảng 41mg, bằng ít nhất khoảng 47mg, nằm trong khoảng từ 35mg đến 60mg, từ 40mg đến 60mg, từ 45mg đến 60mg, khoảng 39,1mg, khoảng 41,8mg hoặc khoảng 47,2mg.

35. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 34, trong đó ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, nằm trong khoảng từ 80% đến 98%, hoặc từ 80% đến 93%, hạt không đi qua rây có kích thước mắt lưới 2,8mm.

36. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 35, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây có chỉ số thu hoạch bằng ít nhất 40%, nằm trong khoảng từ 40% đến 60%, từ 40% đến 55%, hoặc từ 40% đến 50%.

37. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 36, trong đó hạt có tỷ số độ dài/độ dày nhỏ hơn khoảng 5, nhỏ hơn khoảng 4, nhỏ hơn khoảng 3,8, nằm trong khoảng từ 2 đến 5, hoặc từ 2,5 đến 3,8.

38. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 37, trong đó mạch nha hoặc hèm rượu được tạo ra từ hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn khoảng 50ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 20ppm.

39. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 38, trong đó hạt, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên, có mức kiểu đại nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc không chứa một hoặc nhiều hơn một hoặc toàn bộ các hordein sau:

- i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,
- ii) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,
- iii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
- iv) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56,

trong đó mỗi mức nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2% là so với hạt lúa mạch kiều đại, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên, của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

40. Phương pháp theo điểm 39, trong đó B-hordein là ít nhất B1-hordein và B3-hordein.

41. Phương pháp theo điểm 39 hoặc điểm 40, trong đó hạt, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên, còn có mức kiều đại nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2%, hoặc không chứa:

i) y-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:57, và/hoặc

ii) protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:52,

trong đó mỗi mức nhỏ hơn khoảng 10%, nhỏ hơn khoảng 5% hoặc nhỏ hơn khoảng 2% là so với hạt lúa mạch kiều đại, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên, của giống lúa mạch Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Hindmarsh, hoặc Commander.

42. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 41, trong đó hạt là đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ, hoặc trong đó mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ.

43. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 42, trong đó hạt là đồng hợp tử về alen vô hiệu của gen mã hóa D-hordein tại locus *Hor2*, hoặc trong đó mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen vô hiệu của gen mã hóa D-hordein, alen vô hiệu này tốt hơn là chứa codon kết thúc, đột biến vị trí cắt, đột biến lệch khung đọc, đoạn xen, đoạn khuyết hoặc mã hóa D-hordein đã được cắt ngắn, hoặc, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa D-hordein đã được loại bỏ.

44. Phương pháp theo điểm 43, trong đó D-hordein đã được cắt ngắn có codon kết thúc nằm ở bộ ba mã hóa axit amin số 150.

45. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 44, trong đó hạt là đồng hợp tử về alen ở locus *Lys3* của cây lúa mạch sinh ra hạt không chứa C-hordein, hoặc trong đó mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên chứa ADN mang alen ở

locus *Lys3*.

46. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 45, trong đó hạt mạch nha hoặc hèm rượu chứa hàm lượng hordein nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,01%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,007%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 0,0027%, nằm trong khoảng từ 0,001% đến 1%, từ 0,001% đến 0,01%, khoảng 0,007%, hoặc khoảng 0,0027%, so với hạt thu được từ cây lúa mạch kiểu đại tương ứng hoặc mạch nha hoặc hèm rượu được tạo ra theo cách tương tự từ hạt thu được từ cây lúa mạch kiểu đại tương ứng.

47. Phương pháp theo điểm 46, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây có hiệu suất hạt bằng ít nhất khoảng 60%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, từ 60% đến 100%, từ 70% đến 100%, từ 80% đến 100%, khoảng 60%, khoảng 70%, khoảng 80%, hoặc khoảng 90% hiệu suất hạt của cây lúa mạch kiểu đại.

48. Phương pháp theo điểm 46 hoặc điểm 47, trong đó trọng lượng trung bình của hạt bằng ít nhất khoảng 70%, ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, hoặc khoảng 100%, trọng lượng hạt của cây lúa mạch kiểu đại.

49. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 48, trong đó hạt, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên, chứa một hoặc nhiều hơn một hoặc toàn bộ các hordein sau với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 2%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, hoặc từ 0,1% đến 10%, khi so với cây lúa mạch kiểu đại tương ứng:

- i) B-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:53,
- i) B-hordein chứa trình tự' axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:54,
- ii) C-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:55, và
- iii) D-hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:56.

50. Phương pháp theo điểm 49, trong đó B-hordein là ít nhất B1 và B3.

51. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 50, trong đó hạt, hoặc mạch nha hoặc hèm rượu tạo ra từ hạt nêu trên còn chứa các protein sau với lượng nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 10%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 5%, nhỏ hơn hoặc bằng khoảng 1%, nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%, hoặc từ 0,1% đến 10%, khi so với cây lúa mạch kiểu đại tương ứng:

i) γ -hordein chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:57, và/hoặc

ii) protein A kiểu avenin chứa trình tự axit amin được đưa ra dưới dạng SEQ ID NO:52.

52. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 46 đến 51, trong đó cây lúa mạch kiểu đại là Bomi, Sloop, Baudin, Yagan, Plindmarsh, hoặc Commander.

53. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 52, trong đó trọng lượng hạt trung bình ít nhất cao gấp 1,05 lần, ít nhất 1,1 lần hoặc từ 1,05 đến 1,3 lần hạt:

i) đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ,

ii) đồng hợp tử về alen ở locus *Lys3* của cây lúa mạch sinh ra hạt thiếu C-hordein, và

iii) đồng hợp tử về alen kiểu đại của D hordein mã hóa protein có chiều dài đầy đủ.

54. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 53, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây có hiệu suất hạt ít nhất gấp 1,20 lần, hoặc ít nhất gấp 1,35 lần, hoặc gấp từ 1,2 đến 1,5 lần, hoặc gấp từ 1,2 đến 2,0 lần so với hạt thu được từ cây:

i) đồng hợp tử về alen của locus *Hor2*, tại đó hầu hết hoặc toàn bộ gen mã hóa B-hordein đã được loại bỏ,

ii) đồng hợp tử về alen ở locus *Lvs3* của cây lúa mạch sinh ra hạt thiếu C-hordein, và

iii) đồng hợp tử về alen kiểu đại của D hordein mã hóa protein có chiều dài đầy đủ.

55. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 54, trong đó ít nhất khoảng 50% hệ gen của hạt lúa mạch giống với hệ gen của giống lúa mạch Sloop, Hindmarsh, Oxford hoặc Maratime.

56. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 55, trong đó hạt có nguồn gốc từ cây không chuyển gen.

57. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 56, trong đó hạt có

nguồn gốc từ cây chuyển gen.

58. Phương pháp theo điểm 57, trong đó cây chứa gen chuyển mã hóa polynucleotit điều hòa giảm sự tạo ra của ít nhất một hordein trong hạt.

59. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 58, trong đó phương pháp này bao gồm bước tạo mạch nha từ hạt.

60. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 59, trong đó đồ uống trên cơ sở mạch nha là bia và phương pháp này bao gồm bước làm nảy mầm hạt hoặc hạt vỡ được tạo ra từ đó.

61. Phương pháp theo điểm 60, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân đoạn hạt đã được làm nảy mầm và làm khô thành hai hoặc nhiều trong số phân đoạn nội nhũ, phân đoạn lớp nội mô, phân đoạn vỏ, phân đoạn mầm ngọn cuộn, và phân đoạn mạch nha có rễ con; và bước phối hợp và bước trộn các lượng đã định của hai hoặc nhiều phân đoạn này.

62. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 61, trong đó ít nhất khoảng 50% hạt nảy mầm trong 3 ngày sau khi ngâm.

63. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 62, trong đó thành phần đồ uống trên cơ sở mạch nha là mạch nha, hoặc hèm rượu.

64. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 63, trong đó đồ uống trên cơ sở mạch nha là bia hoặc rượu uýt-ki.

65. Cây lúa mạch sinh ra hạt chứa hordein với hàm lượng nhỏ hơn hoặc bằng 50ppm.

66. Cây lúa mạch theo điểm 65, trong đó hạt có một hoặc nhiều dấu hiệu được xác định trong các điểm từ 2 đến 28.

67. Hạt của cây lúa mạch theo điểm 65 hoặc điểm 66.

68. Phương pháp sản xuất hạt lúa mạch, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) trồng cây lúa mạch như được xác định trong điểm 65 hoặc điểm 66,
- b) thu hoạch hạt, và
- c) tùy ý xử lý hạt.

69. Phương pháp theo điểm 68, trong đó phương pháp này bao gồm bước trồng ít nhất

10000 cây trên cánh đồng có diện tích ít nhất 1 hecta (10000m²).

70. Phương pháp sản xuất bột thu được từ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu hạt như được xác định trong điểm 67, và
- b) xử lý hạt để tạo ra bột.

71. Phương pháp sản xuất bột nguyên cám thu được từ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu hạt như được xác định trong điểm 67, và
- b) xử lý hạt để tạo ra bột nguyên cám.

72. Phương pháp sản xuất tinh bột thu được từ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu hạt như được xác định trong điểm 67, và
- b) xử lý hạt để tạo ra tinh bột.

73. Phương pháp sản xuất mạch nha thu được từ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu hạt như được xác định trong điểm 67, và
- b) xử lý hạt để tạo ra mạch nha.

74. Phương pháp sản xuất hèm rượu thu được từ hạt, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu hạt như được xác định trong điểm 67, và
- b) xử lý hạt để tạo ra hèm rượu.

75. Sản phẩm được tạo ra từ cây lúa mạch như được xác định trong điểm 65 hoặc điểm 66, hoặc hạt như được xác định trong điểm 67.

76. Sản phẩm theo điểm 75, trong đó sản phẩm này là thành phần thực phẩm, thành phần đồ uống trên cơ sở mạch nha, sản phẩm thực phẩm hoặc sản phẩm đồ uống trên cơ sở mạch nha.

77. Sản phẩm theo điểm 76, trong đó sản phẩm đồ uống trên cơ sở mạch nha này là bia hoặc rượu uýt-ki.

78. Sản phẩm theo điểm 75, trong đó sản phẩm này là sản phẩm không phải thực phẩm.
79. Sản phẩm theo điểm 78, trong đó sản phẩm không phải thực phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm: màng, lớp bao, chất kết dính, vật liệu xây dựng và vật liệu bao gói.
80. Thực phẩm được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 31.
81. Đồ uống trên cơ sở mạch nha được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp như được xác định trong điểm bất kỳ trong số các điểm từ 32 đến 64.
82. Bia chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với lượng nhỏ hơn 0,9ppm.
83. Bia theo điểm 82, trong đó bia này chứa etanol với hàm lượng bằng ít nhất 2%.
84. Bột chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với hàm lượng nhỏ hơn khoảng 10ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 5ppm.
85. Bột nguyên cám chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với hàm lượng nhỏ hơn khoảng 10ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 5ppm.
86. Mạch nha chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với hàm lượng nhỏ hơn khoảng 50ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 20ppm.
87. Hèm rượu chứa một hoặc nhiều protein hạt lúa mạch và hordein với hàm lượng nhỏ hơn khoảng 50ppm, hoặc nhỏ hơn khoảng 20ppm.

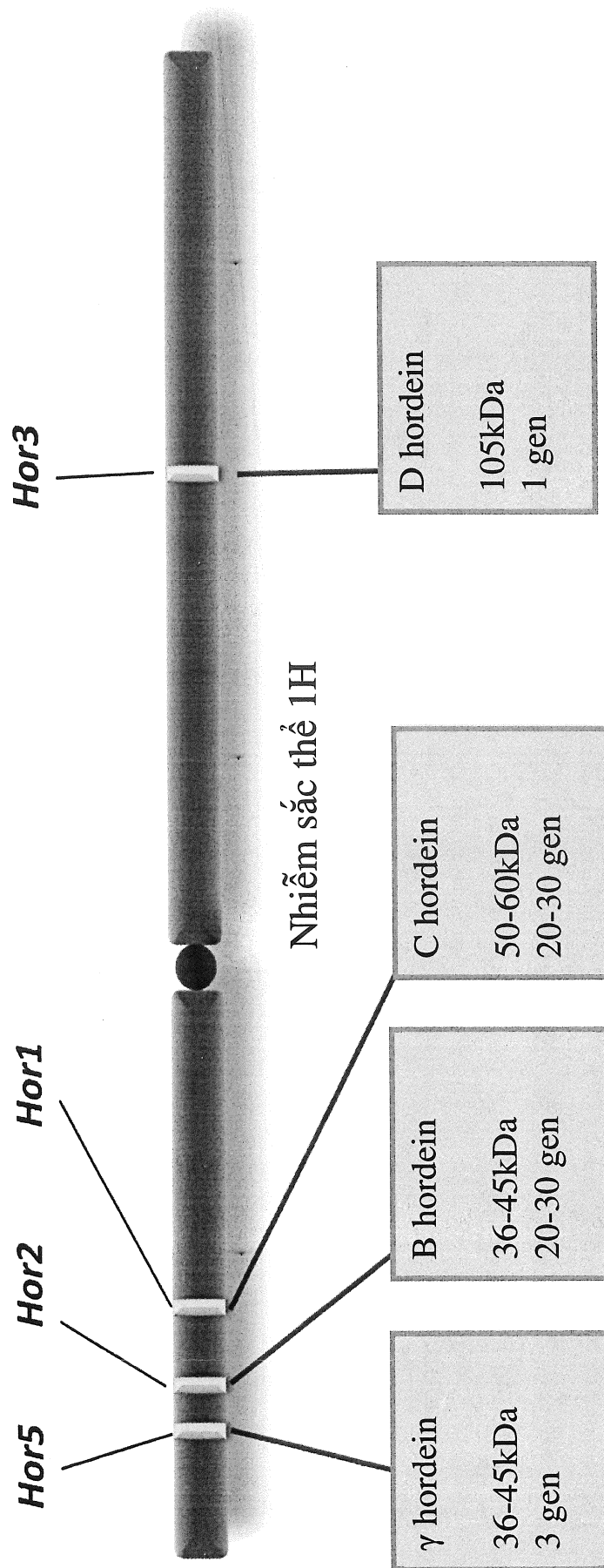


Fig.1

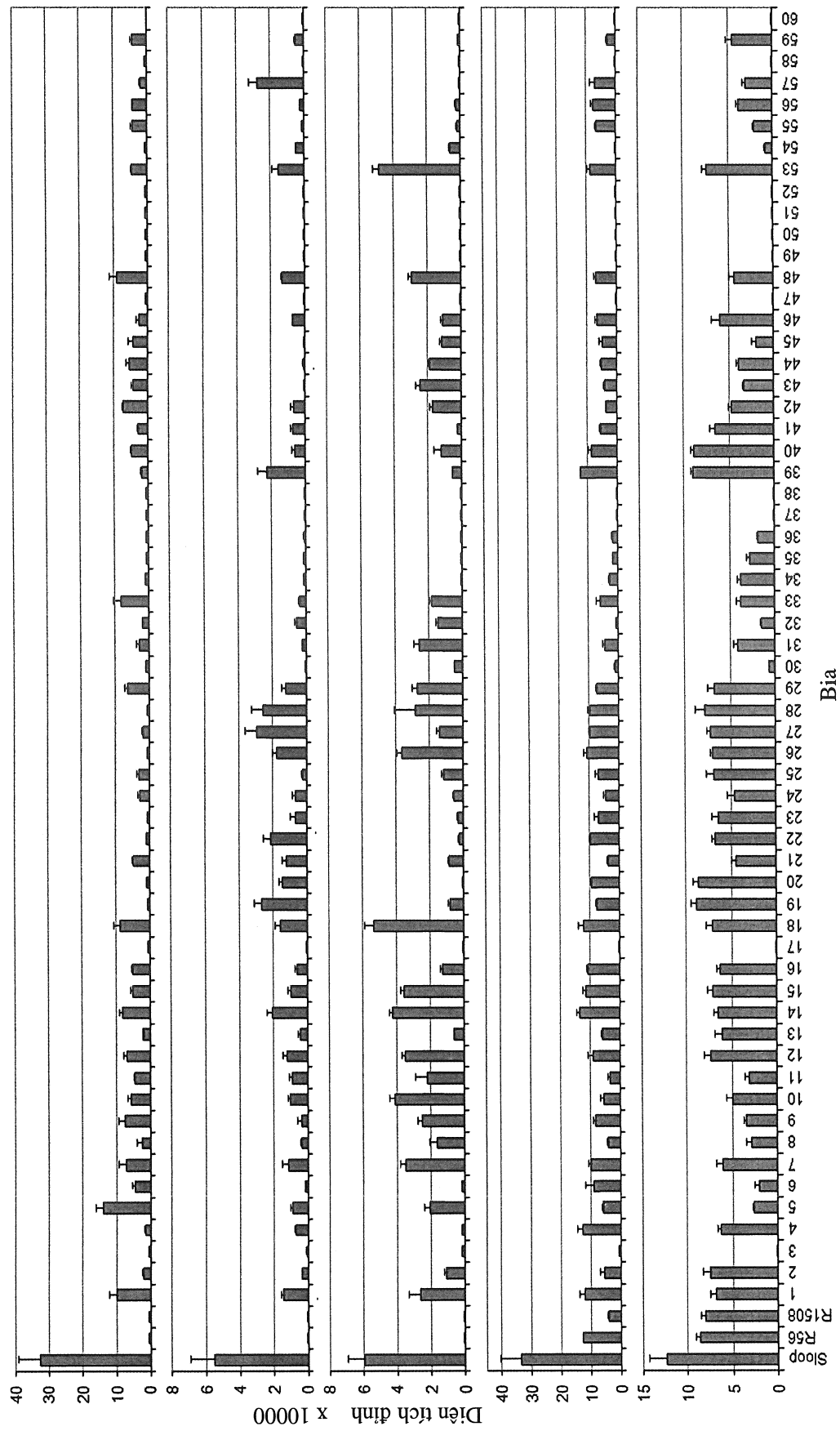


Fig.2

	10	20	30	40	50	60	70	80
Sloop con								
D-null con	MAKRLVLFVAVIVALVALTTAEREINGNNIFLDSRSRQLQCERELQESSLEACRRVVDQQLVGQLPWSTGLQMCCQQLR							
	90	100	110	120	130	140	150	160
Sloop con								
D-null con	DVSPECRPVALSQVVRQYEQQTEVP SKGGSFYPGGTAPPLQGGGWWGTSVKWYYPDQTSSQSWGQGGYHQSVTSSQGP							
	170	180	190	200	210	220	230	240
Sloop con								
	GQGQGGSYPGSTFPQQPGQGQGPGRQPWSYPSATFPQQPGQ~GQGQGGYYPGATSLLPQGQGGPYQSATSPQQPGQ							
	250	260	270	280	290	300	310	320
Sloop con								
	GQGHQETYPFATSPHQPQGWQPGQGGQGGYPSVTSPQSGQGQGTGYPSTTSPQSGQGQQLGQGGQPGQGGYPSATF							
	330	340	350	360	370	380	390	400
Sloop con								
	PQQPGQWQGSYPSTTSPQSGQGQGGYNP SGTSTQQPGQVQQLGQGQGGYYP IATSPQQPGQGGQQLGQGQPGHGGQQLV							
	410	420	430	440	450	460	470	480
Sloop con								
	QGQGGQGGQGGHYP SMTSPHQTGQGGKGYYP SAI SPQSGQGQGGYQPSGASSQGSVQACQHSTSSPQQQAQGCQASSP							
	490	500	510	520	530	540	550	560
Sloop con								
	KQGLGSLYYP SGAYTQQKPGQGNP GGTSPLHQGGGGF GGGLTTEQPQGGKQPFHCQQT TVSPHQGGQTTVSPHQGGQTT							
	570	580	590	600	610	620	630	640
Sloop con								
	VSPHQGGQTTVSPHQGGQTTVSPHQGGQTTVSPHQGGQTTVSPHPGQQT TVSPHQGGQTTVSPHPGQQT TVSPHQGGQTT							
	650	660	670	680	690	700	710	720
Sloop con								
	VSPHQGGQTTVSPHQGGQTTVSPHQGGQTTVSPHQGGQPGEQPCGFPGQQT TVSLHHGQGSNELYYGSPYHVSVEQPSAS							
	730	740	750					
Sloop con								
	LKVAKAQQLAAQLPAMCRLEGGGGLLASQ*							

Fig.3

	10	20	30	40	50	60	70
Sloop con							
D-null con	GACACATATTCTGCCAAAACCCAGAACAAATAATCAC'TTCTCGTAGATGAAGAGAACAGACCAGATACA						
							
	80	90	100	110	120	130	140
Sloop con							
D-null con	AACGTCCACGCTTCAGCAAACAGTACCCCAGAACTAGGATTAAGCCGATTACGGCGCTTTAGCAGACCGT						
							
	150	160	170	180	190	200	210
Sloop con							
D-null con	CCAAAAAAAGTGT'TTGCAAAGCTCCAATTCCTTGC'TTATCCAATTTCTTTTGTGTTGGCAAAGTGC						
							
	220	230	240	250	260	270	280
Sloop con							
D-null con	ACTTGTCCAACCGATTTTGTTC'TTCCCGTGTTTCTTCTTAGGCTAACTAACACAGCCGTGCACATAGCCA						
	 C						
	290	300	310	320	330	340	350
Sloop con							
D-null con	TGGTCCGGAATCTTCACCTCGTCCTTATAAAAGCCAGCCAATCTCCACAATCTCATCATCACCAGAAAC						
							
	360	370	380	390	400	410	420
Sloop con							
D-null con	ACCGAGAACCACAAAAGTCTAGAGATCAATTCATTGACAGTCCACCGAGATGGCTAAGCGGCTGGTCTCTTT						
							
	M A K R L V L F						
	M A K R L V L F						
							
	430	440	450	460	470	480	490
Sloop con							
D-null con	TGTGGCGGTAATCGTCGCCCTCGTGGCTCTCACCACCGCTGAACGTGAGATCAATGGGAACAACATTTTC						
	V A V I V A L V A L T T A E R E I N G N N I F						
							
	V A V I V A L V A L T T A E P E I N G N N I F						
							
	500	510	520	530	540	550	560
Sloop con							
D-null con	CTTGATAGCCGCTCTAGGCAGCTACAGTGTGAGCGCGAGCTCCAGGAGAGCTCGCTCGAGGCGTGCCGGC						
	L D S R S R Q L Q C E R E L Q E S S L E A C R R						
							
	L D S R S G Q L Q C E R E L Q E S S L E A C R R						
							
	570	580	590	600	610	620	630
Sloop con							
D-null con	GGGTCGTGGACCAACAGCTGGTTGGCCAGCTGCCATGGAGCACGGGGCTCCAGATGCAGTGCTGCCAGCA						
	V V D Q Q L V G Q L P W S T G L Q M Q C C Q Q						
							
	V V D Q Q L V G Q L P W S T G L Q M Q C C Q Q						
							
	640	650	660	670	680	690	700
Sloop con							
D-null con	GCTTCGGGACGTCTAGCCCCGAGTGCCGCCCGTCTGCCCTCAGCCAGGTCGTGAGGCAATACGAGCAGCAA						
	L R D V S P E C R P V A L S Q V V R Q Y E Q Q						
							
	L R D V S P E C R P V A L S Q V V R Q Y E Q Q						

Fig.4

	710	720	730	740	750	760	770
Sloop con		ACCGAGGTGCCATCCAAGGGAGGATCCTTCTACCCGGGCGGGACCGCACC GCCCTGCAGCAAGGAGGAT					
D-null con		T E V P S K G G S F Y P G G T A P P L Q Q G G W					
	780	790	800	810	820	830	840
Sloop con		GGTGGGGAACCTCTGTAAAATGGTACTACCCAGACCAACTTCTTCGCAACAGTCATGGCAAGGGCAACA					
D-null con		W G T S V K W Y Y P D Q T S S Q Q S W Q G Q Q					
	850	860	870	880	890	900	910
Sloop con		AGGGTACCACCAAAGCGTAACCTTCTTCCAGCAGCCAGGACAAGGGCAGCAAGGGTCTTACCCAGGTTCA					
D-null con		G Y H Q S V T S S Q Q P G Q G Q Q G S Y P G S					
	920	930	940	950	960	970	980
Sloop con		ACTTTCGCCAGCAGCCAGGACAAGGACAACAACAGGACAGAGGCAGCCATGGTCCTATCCAAGTGCAA					
D-null con		T F P Q Q P G Q G Q Q P G Q R Q P W S Y P S A T					
	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
Sloop con		CTTTCGCCACAACAGCCAGGGC-----AAGGGCAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAGGCGCAACTTCCCT					
D-null con		F P Q Q P G Q G Q G Q Q G Y Y P G A T S L					
	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
Sloop con		GCTGCAGCCAGGACAAGGGCAACAAGGGCCCTACCAGAGTGCAACTTCTCCACAGCAGCCAGGACAAGGA					
D-null con		L Q P G Q G Q Q G P Y Q S A T S P Q Q P G Q G					
	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190
Sloop con		CAGGGACACCAAGAGACCTATCAATTGCAACTTCCCCGCATCAGCCAGGACAATGGCAACAACAGGAC					
D-null con		Q G H Q E T Y Q F A T S P H Q P G Q W Q Q P G Q					
	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Sloop con		AAGGGCAACAAGGGTACTACCCAAGTGTAACCTTCTCCACAACAGTCGGGACAAGGGCAACAGGGTACCC					
D-null con		G Q Q G Y Y P S V T S P Q Q S G Q G Q T G Y P					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
Sloop con		AAGTACAACCTTCTCCACAACAATCGGGGCAAGGGCAACAGCTGGGACAAGGGCAACAACAGGACAAGGG					
D-null con		S T T S P Q Q S G Q G Q Q L G Q G Q Q P G Q G					
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
Sloop con		CAACAAGGGTACCCAAGTGCAACTTTTCCACAACAGCCAGGACAATGGCAACAAGGGTCTTACCCAAGTA					
D-null con		Q Q G Y P S A T F P Q Q P G Q W Q Q G S Y P S T					

Fig.4 (tiếp tục)

```

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAACTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGGCAACAAGGGTACAACCCAAGTGGAACTTCTACGCAGCAGCC
T S P Q Q S G Q G Q Q G Y N P S G T S T Q Q P
D-null con  .....

      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGGACAAGTGCAACAGTTGGGACAAGGGCAACAAGGGTACTACCCAATTGCAACTTCTCCGCAGCAGCCA
G Q V Q Q L G Q G Q Q G Y Y P I A T S P Q Q P
D-null con  .....

      1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGACAAGGGCAACAGCTAGGACAAGGGCAACAACCAGGACATGGGCAACAGCTAGTGCAAGGGCAACAAC
G Q G Q Q L G Q G Q Q P G H G Q Q L V Q G Q Q Q
D-null con  .....

      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGGACAAGGGCAACAAGGACACTACCCAAGTATGACTTCTCCGCACCAACAGGACAAGGGCAAAAAGG
G Q G Q Q G H Y P S M T S P H Q T G Q G Q K G
D-null con  .....

      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATACTACCCAAGTGCAATTTCTCCGCAGCAGTCAGGACAAGGACAACAAGGATACCAGCCTAGTGGAGCT
Y Y P S A I S P Q Q S G Q G Q Q G Y Q P S G A
D-null con  .....

      1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCTTCACAGGGGTCGGTGCAAGGGGCGTGCCAGCACAGCACATCTTCTCCGCAGCAGCAAGCACAAAGGT
S S Q G S V Q G A C Q H S T S S P Q Q Q A Q G C
D-null con  .....A.....

      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCCAAGCTTCTTCACCAAGCAAGGGCTAGGGTCGTTGTACTACCCGAGTGAGCTTATACACAACAGAA
Q A S S P K Q G L G S L Y Y P S G A Y T Q Q K
D-null con  .....

      1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACCAGGGCAAGGGTACAACCCAGGTGGAAGTTCTCCGCTGCACCAGCAAGGGGGAGGGTTCCGGCGCGGG
P G Q G Y N P G G T S P L H Q Q G G G F G G G
D-null con  .....

      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTAACGACGGAGCAACCGCAGGGAGGAAAGCAGCCATTCCATTGCCAGCAAACCACTGTCTCCCTCACC
L T T E Q P Q G G K Q P F H C Q Q T T V S P H Q
D-null con  .....

      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGGTCAGCAAACCACTGTTTCCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACTGTCTCCCCTCATCAGGGTCAGCA
G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q
D-null con  .....C.....

```

Fig.4 (tiếp tục)

```

      2110      2120      2130      2140      2150      2160      2170
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACCACTGTCTCCCCTCACCAGGGTCAGCAAACCACCGTCTCCCCTCACCAGGGTCAGCAAACCACCGTC
T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V
D-null con  -----

      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACTGTCTCCCCTCATCCGGGTCAGCAAACCACTGTCTCCCCTCATC
S P H Q G Q Q T T V S P H P G Q Q T T V S P H Q
D-null con  -----

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGGTCAGCAAACCACTGTCTCCCCTCATCCGGGTCAGCAAACCACTGTCTCCCCTCATCAGGGTCAGCA
G Q Q T T V S P H P G Q Q T T V S P H Q G Q Q
D-null con  -----

      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACCACTGTCTCCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACCGTCTCCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACCGTC
T T V S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q T T V
D-null con  .....C.....

      2390      2400      2410      2420      2430      2440      2450
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCCCCTCATCAGGGTCAGCAAACCACCGTCTCCCCTCATCAGGGTCAGCAGCCCGGCGAGCAGCCTTGCG
S P H Q G Q Q T T V S P H Q G Q Q P G E Q P C G
D-null con  .....C.....

      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GTTTCCCTGGCCAGCAAACCACCGTGTCTCTGCACCATGGTCAGCAGTCCAACGAGTTGTACTACGGCAG
F P G Q Q T T V S L H H G Q Q S N E L Y Y G S
D-null con  .....

      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCCATAACCATGTTAGCGTGGAGCAGCCGTCCGGCCAGCCTAAAGGTAGCAAAGGCGCAGCAGCTCGCGGCG
P Y H V S V E Q P S A S L K V A K A Q Q L A A
D-null con  .....A

      2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAGCTGCCGGCAATGTGTCCGGCTGGAGGGCGGGCGGCCTGTTGGCCAGCCAGTAGTAGAACTCTGGCA
Q L P A M C R L E G G G G L L A S Q *
D-null con  .....

      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCTCGCATGGTGCTTGGGCATGCATGCATCTTAGCTATACAATAAACGTGACGTGTGCTTGCAGTTTTTC
D-null con  .....C.....

      2740      2750      2760      2770      2780      2790      2800
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATGTAACTAGGGTAAAACCAACAATAATGCAAACGGAAAGCTTCTCCATCCAAAAAAGAAACAAACT
D-null con  .....

      2810      2820      2830      2840
Sloop con  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGTGCTATATAGTATGCGCTACATGTCTCAGCTCATTGTCAG
D-null con  .....

```

Fig.4 (tiếp tục)

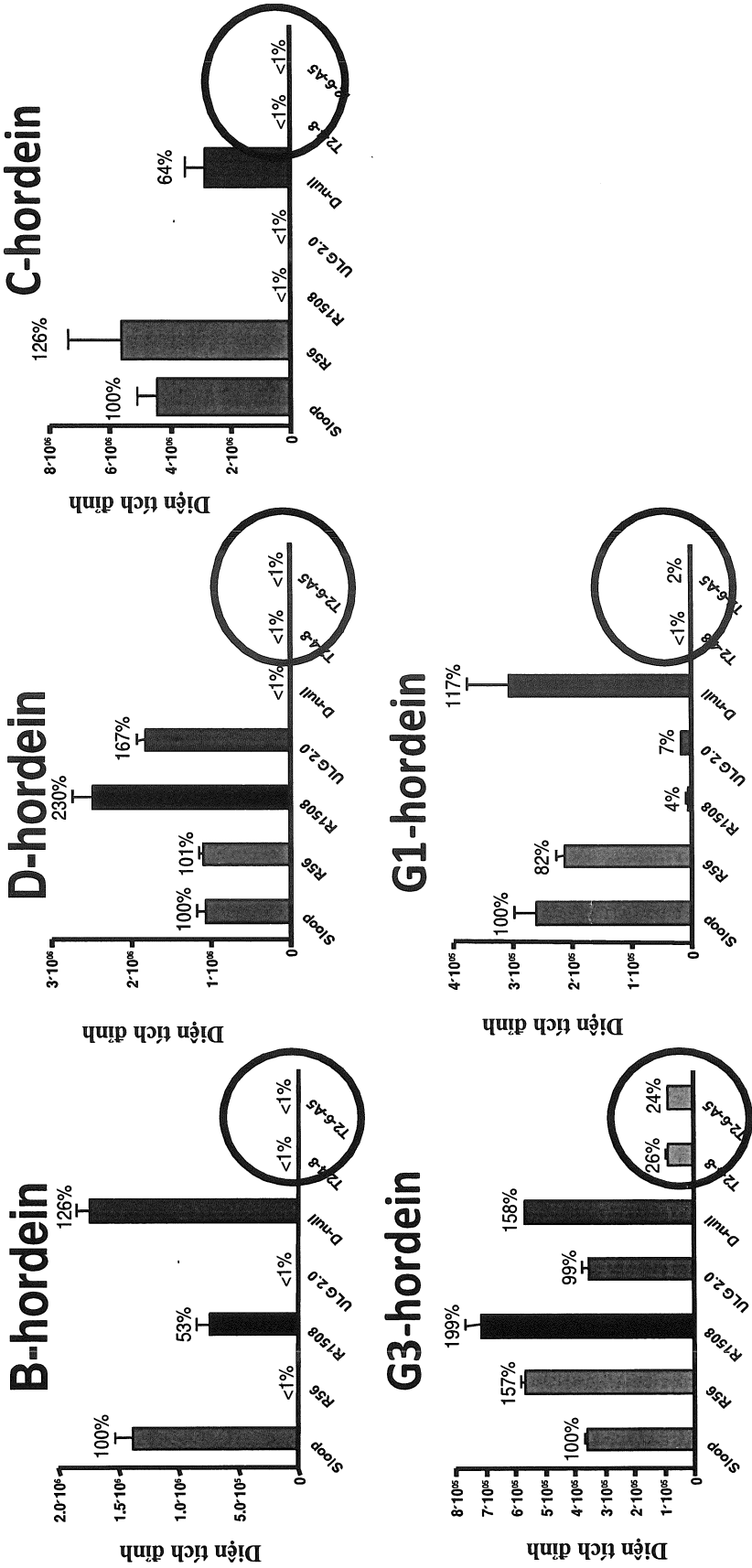


Fig.5

Kết quả phân tích MRM của bột triple null

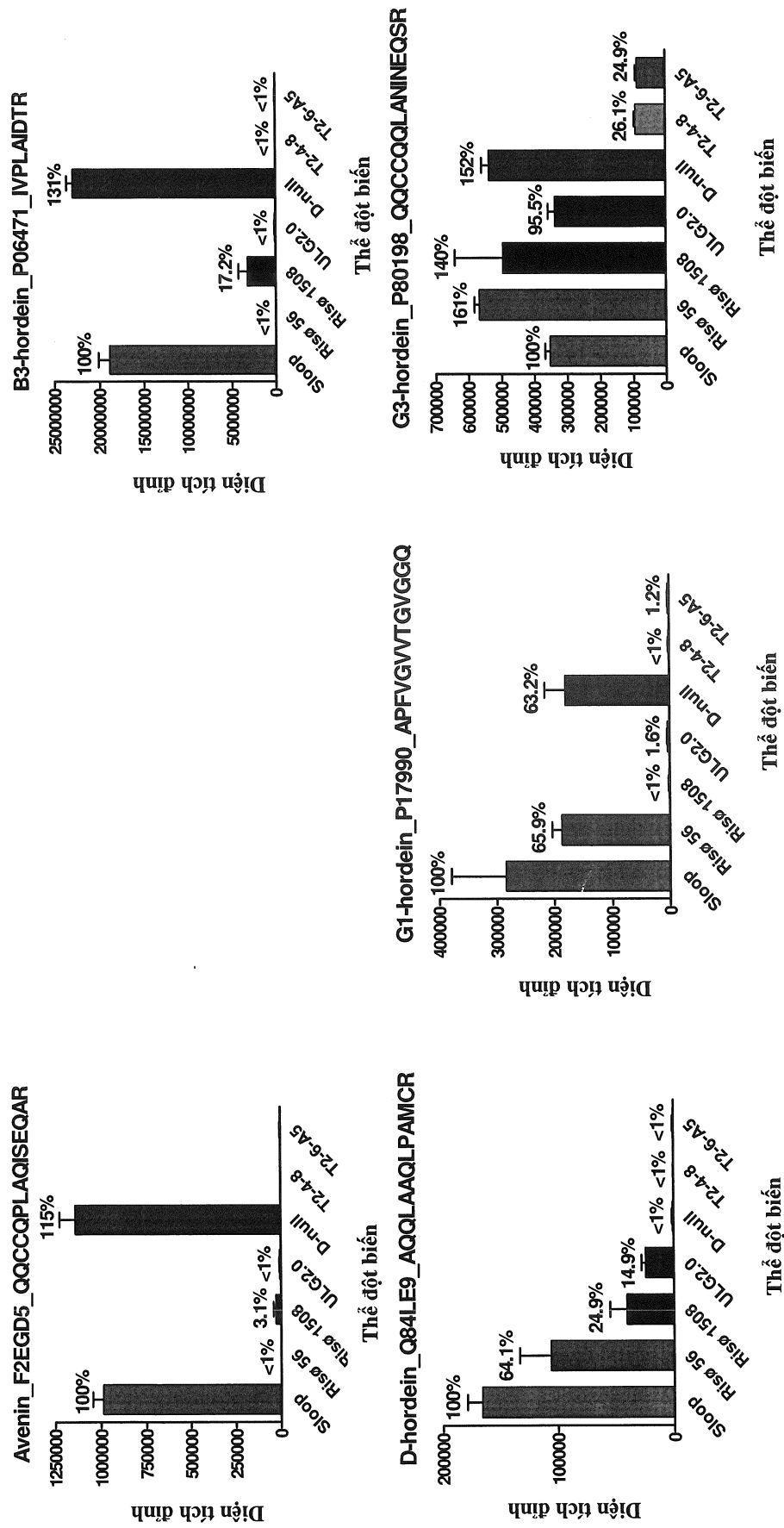


Fig.6

Kết quả phân tích MRM của bia triple null

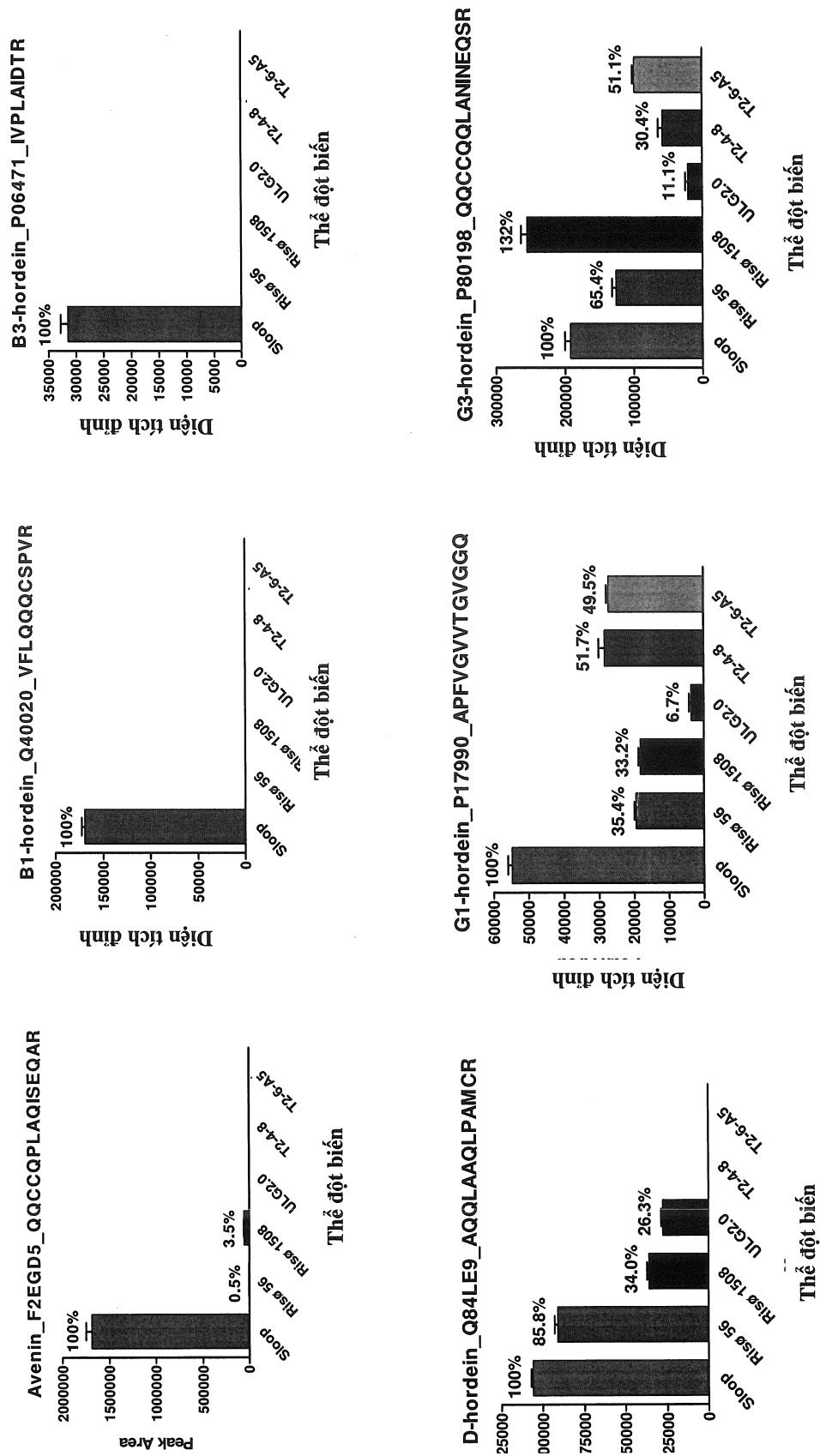


Fig.7

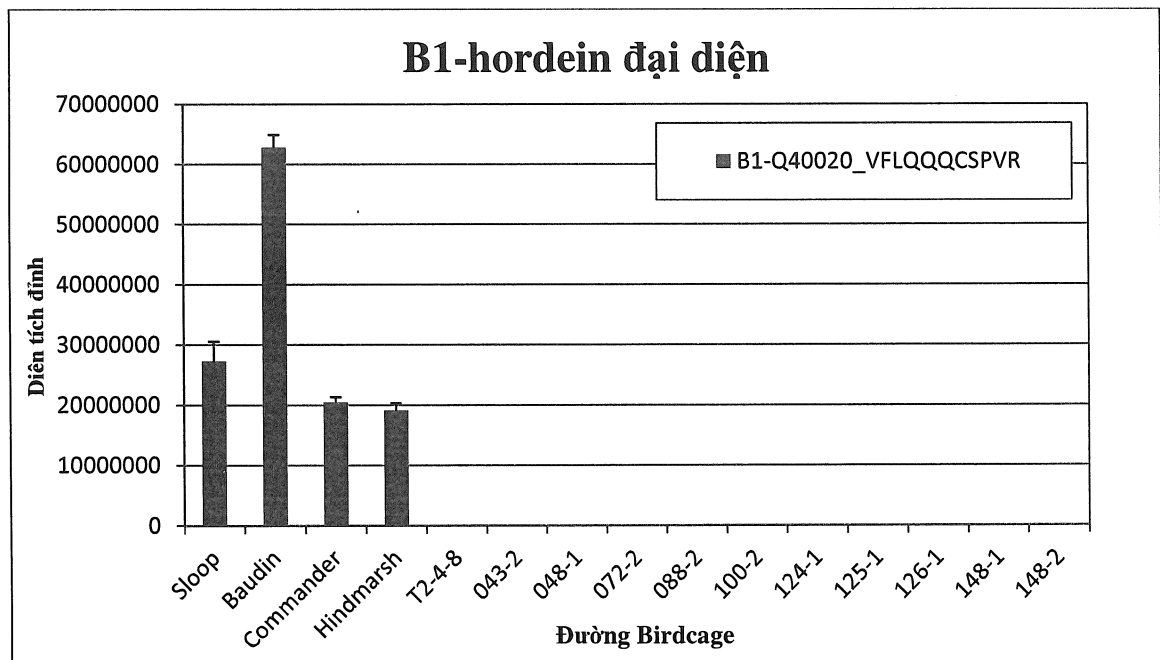
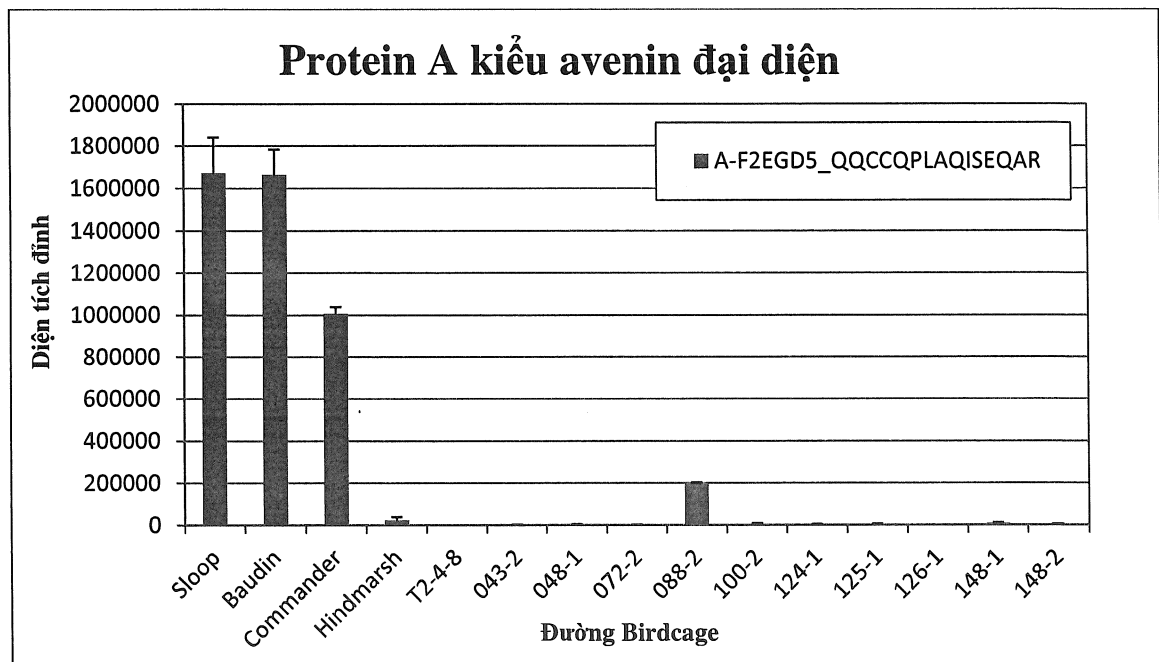


Fig.8

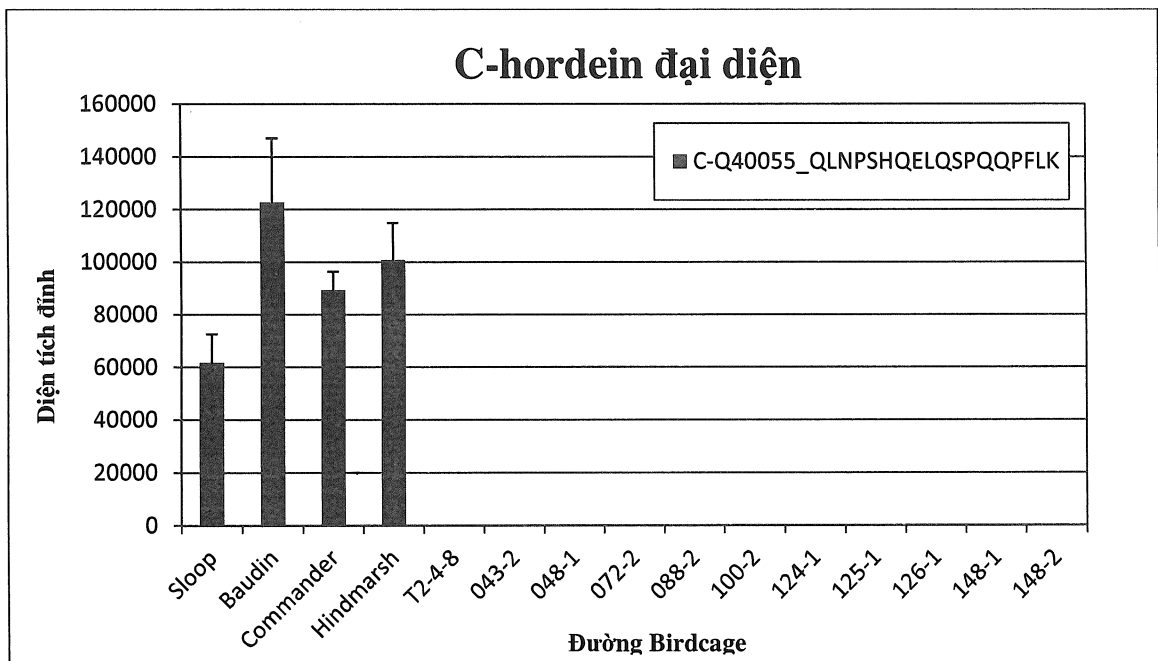
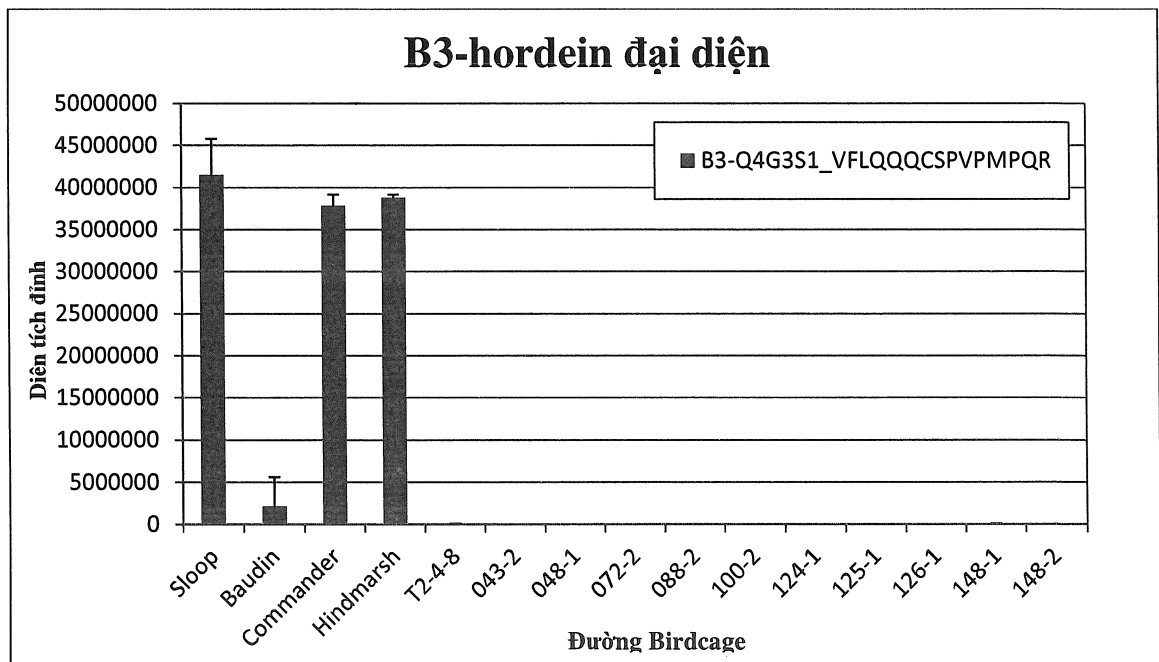


Fig.8 (tiếp tục)

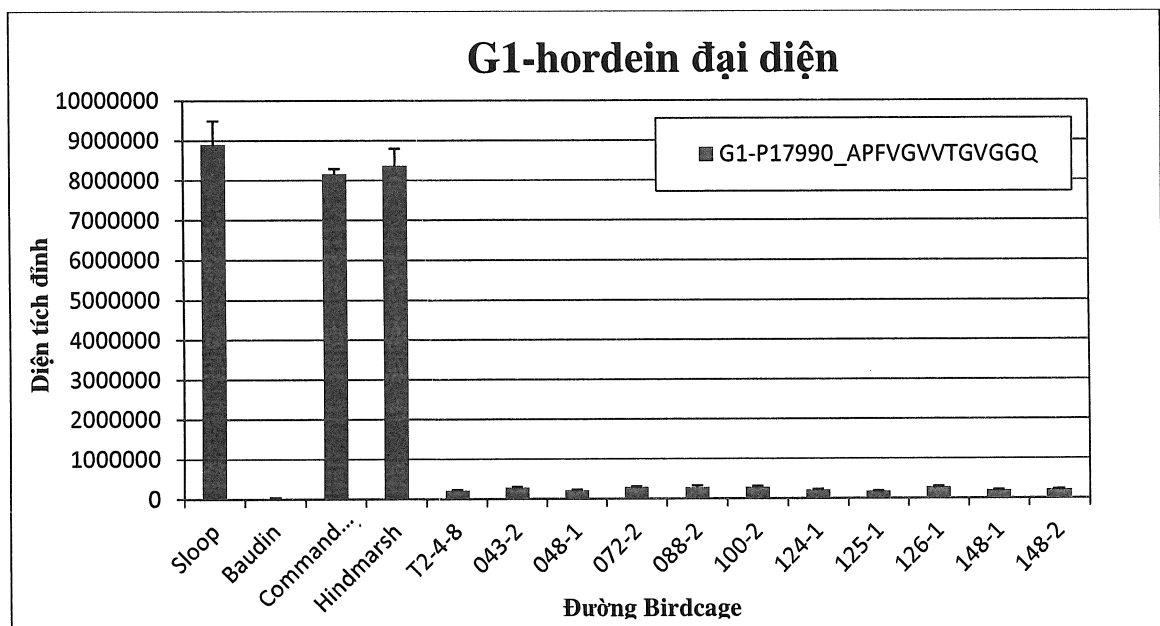
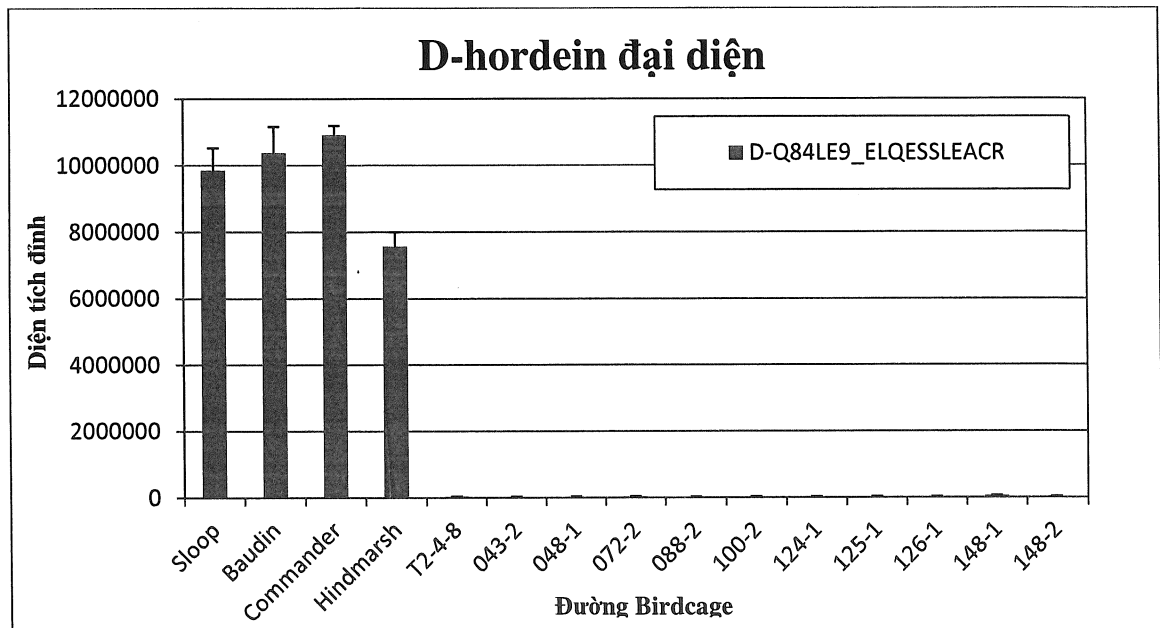


Fig.8 (tiếp tục)

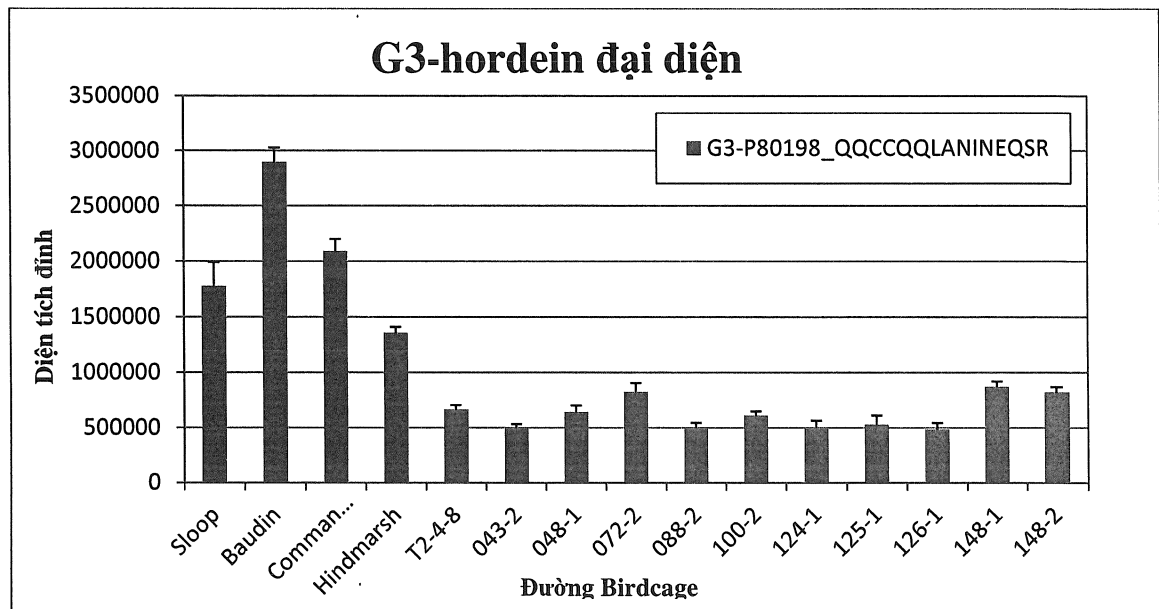


Fig.8 (tiếp tục)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research
 Organisation
 Grain Research and Development Corporation

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THÀNH PHẦN THỰC PHẨM TỪ CÂY LÚA MẠCH CHỨA
 HORDEIN VỚI HÀM LƯỢNG THẤP, CÂY LÚA MẠCH VÀ SẢN PHẨM ĐƯỢC TẠO RA
 TỪ CÂY LÚA MẠCH NÀY

<130> 515268

<150> AU 2013902140
 <151> 2013-06-13

<150> AU 2013902565
 <151> 2013-07-11

<160> 85

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 1

Glu	Leu	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Glu	Leu	Pro	Tyr	Pro	Gln	Pro	Gln
1				5					10					15	

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 2

Glu	Gln	Pro	Phe	Pro	Gln	Pro	Glu	Gln	Pro	Phe	Pro	Trp	Gln	Pro	
1				5					10					15	

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 3

Glu	Pro	Glu	Gln	Pro	Ile	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Gln	Gln
1				5					10					15	

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 4

Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln
 1 5 10 15

Ser

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 5

Gln Gln Cys Cys Gln Pro Leu Ala Gln Ile Ser Glu Gln Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 6

Met Val Leu Gln Thr Leu Pro Ser Met Cys Arg
 1 5 10

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 7

Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln
 1 5

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 8

Phe Val Gln Pro Gln Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His Gln Pro
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 9

Tyr Pro Glu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Trp Gln Gln Pro Thr
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 10

Leu Glu Arg Pro Gln Gln Leu Phe Pro Gln Trp Gln Pro Leu Pro Gln
 1 5 10 15

Gln Pro Pro

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 11

Leu Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His
 1 5 10 15

Gln Pro

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secale cereale

<400> 12

Gln Gln Pro Phe Pro
 1 5

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secale cereale

<400> 13

Gln Gln Gln Phe Pro
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secale cereale

<400> 14

Leu Gln Pro Phe Pro
 1 5

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Secale cereale

<400> 15

Gln Leu Pro Phe Pro
1 5

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 16

Arg Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
1 5 10 15

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 17

Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 18

Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
1 5 10 15

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 19

Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp
1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 20

Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
1 5 10

<210> 21

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 21

Gln Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
 1 5 10

<210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 22

Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met
 1 5 10

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 23

Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
 1 5 10

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 24

Leu Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly
 1 5 10

<210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 25

Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met
 1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 26

Val Gly Gln Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu
 1 5 10

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Pyroglutamic acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> HexNAc

<400> 27

Gln Leu Ala Ala Gln Leu Pro Ala Met Cys Arg Leu Glu Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 28

Val Val Arg Gln Tyr Glu Gln Gln Thr Glu Val Pro Ser Lys Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Phe Tyr Pro Gly Gly Thr Ala Pro Pro
 20 25

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 29

Phe Val Leu Pro Gln Gln Gln Ala Gln Phe Lys Val Val Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 30

Phe Val Leu Pro Gln Gln Gln Ala Gln Phe
 1 5 10

<210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 31

Ala	Ile	Val	Met	Gln	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Gln	Val	Gly	His	Gly	Phe
1				5					10					15	

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 32

Leu	Glu	Arg	Pro	Gln	Gln	Leu	Phe	Pro	Gln	Trp	Gln	Pro	Leu	Pro	Gln
1				5					10					15	

Gln Pro Pro

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 33

Leu	Phe	Pro	Gln	Trp	Gln	Pro	Leu	Pro	Gln	Gln	Pro	Pro
1			5						10			

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 34

Leu	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Met	Pro	Ile	Gln	Leu
1			5						10		

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 35

Val	Val	Gly	Ser	Leu	Val	Ile	Gln	Thr
1				5				

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 36

Leu	Gln	Gln	Pro	Gln	His	Gln	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Gln	Gln	Phe	Pro
1				5					10					15	

Gln Arg Pro

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 37

Tyr	Pro	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln	Pro	Phe	Pro	Trp	Gln	Gln	Pro	Thr
1				5					10					15

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 38

Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gln	Gln	Leu	Ala	Gln	Met	Glu
1				5					10		

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Pyroglutamic acid

<400> 39

Gln	Pro	Gln	His	Gln	Phe	Pro	Gln	Pro	Thr	Gln	Gln	Phe	Pro	Gln	Arg
1				5					10					15	

Pro

<210> 40
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 40

Phe	Val	Gln	Pro	Gln	Gln	Gln	Val	Pro	Val	Glu	Ile	Thr	Arg
1				5					10				

<210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 41

Phe Val Gln Pro Gln Gln Gln Val Pro Val Glu Ile
 1 5 10

<210> 42
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 42

Leu Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His
 1 5 10 15

Gln Pro

<210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 43

Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro His Gln
 1 5 10 15

Pro

<210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 44

Val Gln Val Gln Ile Pro Phe Val His Pro Ser Ile
 1 5 10

<210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 45

Ser Phe Gly Gln Pro Gln Gln Gln Val Pro Val Glu Val Met Arg
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 46

Ile Ile Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln

1 5 10 15
Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln Gln Pro
 20 25

```
<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
```

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> dansyl-glutamic acid (DEA)

```

<400> 47

Ile Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Pro
1 5 10

<210>	48
<211>	14
<212>	PRT
<213>	Hordeum vulgare

<400> 48

Thr Leu Pro Thr Met Cys Ser Val Asn Val Pro Leu Tyr Arg
1 5 10

```
<210> 49
<211> 16
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
```

<400> 49

Asp Val Ser Pro Glu Cys Arg Pro Val Ala Leu Ser Gln Val Val Arg
1 5 10 15

```
<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
```

<400> 50

Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Ala Asn Ile Asn Glu Gln Ser Arg
1 5 10 15

```
<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> Hordeum vulgare
```

<400> 51

Cys Thr Ala Ile Asp Ser Ile Val His Ala Ile Phe Met Gln Gln Gly

1 5 10 15

Arg

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 52

Gln Gln Cys Cys Gln Pro Leu Ala Gln Ile Ser Glu Gln Ala Arg
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 53

Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro Val Arg
 1 5 10

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 54

Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser Pro Val Pro Met Pro Gln Arg
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 55

Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser Pro Gln Gln Pro Phe
 1 5 10 15

Leu Lys

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 56

Glu Leu Gln Glu Ser Ser Leu Glu Ala Cys Arg
 1 5 10

<210> 57
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 57

Ala Pro Phe Val Gly Val Val Thr Gly Val Gly Gly Gln
 1 5 10

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 58

Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Ala Asn Ile Asn Glu Gln Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 59

Ala Pro Phe Val Gly Val Val Thr Gly Val Gly Gly Gln
 1 5 10

<210> 60
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 60
 gacacatatt ctgccaaaac ccc
 23

<210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 61
 acgagggcga cgattaccgc
 20

<210> 62
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 62
 gagatcaatt cattgacagt ccacc
 25

<210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 63
 cttgtcctga ctgctgcgga gaaa
 24

<210> 64
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 64
 gcaacaagga cactacccaa gtatg
 25

<210> 65
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 65
 gctgacaatg agctgagaca tgtag
 25

<210> 66
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

<400> 66
 ggcaatacga gcagcaaac
 19

<210> 67
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 67
 cctctgtcct ggttggttgc
 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 68
 tcgcaggatc ctgtacaacg
 20

 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 69
 caacaatgaa gaccttcctc
 20

 <210> 70
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 70
 cgagaaggta ccattactcc ag
 22

 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi oligonucleotit

 <400> 71
 agtaacaatg aaggtccatc g
 21

<210> 72
 <211> 2838
 <212> ADN
 <213> Hordeum vulgare

<400> 72
 gacacatatt ctgccaaaac cccagaacaa taatcacttc tcgtagatga agagaacaga 60
 ccaagatata aacgtccacg cttcagcaaa cagtacccca gaactaggat taagccgatt 120
 acgcggcctt agcagaccgt ccaaaaaaac tgttttgcaa agctccaatt cctccttgct 180
 tatccaattt cttttgtgtt ggcaaactgc acttgtccaa ccgattttgt tcttcccgtg 240
 tttcttctta ggctaactaa cacagccgtg cacatagcca tgggccggaa tcttcacctc 300
 gtccctataa aagcccagcc aatctccaca atctcatcat caccgagaac accgagaacc 360
 aaaaaactag agatcaattc attgacagtc caccgagatg gctaagcggc tggctcctctt 420
 tgtggcggta atcgtcgccc tcgtggctct caccaccgct gaacgtgaga tcaatgggaa 480
 caacattttc ctgatagcc gctctaggca gctacagtgt gagcgcgagc tccaggagag 540
 ctcgctcgag gcgtgccggc gggctgtgga ccaacagctg gttggccagc tgccatggag 600
 cacggggctc cagatgcagt gctgccagca gcttcgggac gtcagccccg agtgccgccc 660
 cgtcgccctc agccaggctg tgaggcaata cgagcagcaa accgaggtgc catccaaggg 720
 aggatccttc taccggggcg ggaccgcacc gccgctgcag caaggaggat ggtggggaac 780
 ctctgtaaaa tgggtactacc cagaccaaac ttcttcgcaa cagtcatggc aagggaaca 840
 aggggtaccac caaagcgtaa cttcttccca gcagccagga caagggcagc aagggtccta 900
 cccaggttca actttcccg cagcagccagg acaaggacaa caaccaggac agaggcagcc 960
 atggtcctat ccaagtgcaa ctttcccaca acagccaggg caagggaag ggcaacaagg 1020
 gtactacca ggcgcaactt ccctgctgca gccaggacaa gggcaacaag ggcctacca 1080
 gagtgaact tctccacagc agccaggaca aggacaggga caccaagaga cctatcaatt 1140
 tgcaacttcc ccgcatcagc caggacaatg gcaacaacca ggacaagggc aacaagggtg 1200
 ctaccaagt gtaacttctc cacaacagtc gggacaaggg caaacagggt acccaagtac 1260
 aacttctcca caacaatcgg ggcaaggga acagctggga caagggaac aaccaggaca 1320
 agggcaacaa ggggtaccaa gtgcaacttt tccacaacag ccaggacaat ggcaacaagg 1380
 gtcctacca agtacaactt ctccgcagca gtcaggacaa gggcaacaag ggtacaacc 1440
 aagtggaact tctacgcagc agccgggaca agtgcaacag ttgggacaag ggcaacaagg 1500
 gtactacca attgcaactt ctccgcagca gccaggacaa gggcaacagc taggacaagg 1560

gcaacaacca ggacatgggc aacagctagt gcaagggcaa caacaaggac aagggaaca 1620
 aggacactac ccaagtatga cttctccgca ccaaacagga caagggcaaa aaggatacta 1680
 cccaagtgca atttctccgc agcagtcagg acaaggacaa caaggatacc agcctagtgg 1740
 agcttcttca caggggtcgg tgcaaggggc gtgccagcac agcacatctt ctccgcagca 1800
 gcaagcaciaa ggggtgccaag cttcttcacc aaagcaaggc ctagggtcgt tgtactaccc 1860
 gagtggagct tatacacaac agaaaccagg gcaagggtag aaccaggtg gaacttctcc 1920
 gctgcaccag caagggggag ggttcggcgg cgggttaacg acggagcaac cgcagggagg 1980
 aaagcagcca ttccattgcc agcaaaccac tgtctcccct caccagggtc agcaaaccac 2040
 tgtttcccct catcagggtc agcaaaccac tgtctcccct catcagggtc agcaaaccac 2100
 tgtctcccct caccagggtc agcaaaccac cgtctcccct caccagggtc agcaaaccac 2160
 cgtctcccct catcagggtc agcaaaccac tgtctcccct catccgggtc agcaaaccac 2220
 tgtctcccct catcagggtc agcaaaccac tgtctcccct catccgggtc agcaaaccac 2280
 tgtctcccct catcagggtc agcaaaccac tgtctcccct catcagggtc agcaaaccac 2340
 cgtctcccct catcagggtc agcaaaccac cgtctcccct catcagggtc agcaaaccac 2400
 cgtctcccct catcagggtc agcagcccgg cgagcagcct tgcggtttcc ctggccagca 2460
 aaccaccgtg tctctgcacc atggtcagca gtccaacgag ttgtactacg gcagcccata 2520
 ccatgttagc gtggagcagc cgtcggccag cctaaaggta gcaaaggcgc agcagctcgc 2580
 ggcgcagctg ccggcaatgt gtcggctgga gggcggcggc ggctgttg ccagccagta 2640
 gtagaactct ggcagctcgc atgggtgctt ggcatgcatg catcttagct atacaataaa 2700
 cgtgacgtgt gcttgagtt tttcatgtaa ctagggtaaa acccaacaat aatgcaaaac 2760
 ggaaagcttc tccatccaaa aaaagaacaa aactggtgct atatatagta tgcgctacat 2820
 gtctcagctc attgtcag 2838

<210> 73

<211> 2724

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare

<400> 73

gacacatatt ctgcaaaaac ccagaacaa taatcacttc tcgtagatga agagaacaga 60
 ccaagataca aacgtccacg cttcagcaaa cagtacccca gaactaggat taagccgatt 120
 acgcggcttt agcagaccgt ccaaaaaaac tgttttgcaa agctccaatt cctccttgct 180
 tatccaattt cttttgtgtt ggcaaactgc acttctccaa ccgattttgt tcttcccatg 240

tttcttctta ggctaactaa cacagccgtg cacatagcca tgggtccggaa ccttcacctc	300
gtccctataa aagcccagcc aatctccaca atctcatcat caccgagaac accgagaacc	360
acaaaactag agatcaattc attgacagtc caccgagatg gctaagcggc tggtcctctt	420
tgtggcggta atcgtcgccc tcgtggctct caccaccgct gaacctgaga tcaatgggaa	480
caacattttc cttgatagcc gctctgggca gctacagtgt gagcgcgagc tccaggagag	540
ctcgctcgag gcgtgccggc gggtcgtgga ccaacagctg gttggccagc tgccatggag	600
cacggggctc cagatgcagt gctgccagca gcttcgggac gtcagccccg agtgccgccc	660
cgtcgccctc agccaggctg tgaggcaata cgagcagcaa accgagggtg catccaaggg	720
aggatccttc taccggggcg ggaccgcacc gccgctgcag caaggaggat ggtggggaac	780
ctctgtaaaa tgggtactacc cagaccaaac ttcttcgcaa cagtcatggc aagggaaca	840
agggtagcac caaagcgtaa cttcttccca gcagccagga caagggcagc aagggtccta	900
cccagggtca actttccgc agcagccagg acaaggacaa caaccaggac agaggcagcc	960
atggtcctat ccaagtgcaa ctttccaca acagccaggg caagggaag ggcaaggga	1020
acaagggtac taccaggcg caacttcct gctgcagcca ggacaagggc aacaagggc	1080
ctaccaagt gcaacttctc cacagcagcc aggacaagga cagggacaac aagagcccta	1140
tccaattgca acttccccgc atcagccagg acaatggcaa caaccaggac aagggaaca	1200
agggtactac ccaagtgtaa cttctccaca acagtcggga caagggaac aagggtaccc	1260
aagtacaact tctccacaac aatcggggca agggcaacag ctgggacaag ggcaacaacc	1320
aggacaaggg caacaagggt acccaagtgc aacttttcca caacagccag gacaatggca	1380
acaagggtcc taccgaagta caacttctcc gcagcagtca ggacaagggc aacaagggt	1440
caaccaagt ggaacttcta cgcagcagcc gggacaagtg caacagttgg gacaagggca	1500
acaagggtac taccgaattg caacttctcc gcagcagcca ggacaagggc aacagctagg	1560
acaagggcaa caaccaggac atgggcaaca gctagtgcaa gggcaacaac aaggacaagg	1620
gcaacaagga cactaccaa gtatgacttc tccgcaccaa acaggacaag ggcaaaaagg	1680
atactacca agtgcaattt ctccgcagca gtcaggacaa ggacaacaag gataccagcc	1740
tagtggagct tcttcacagg ggtcggtgca aggggcgtac cagcacagca catcttctcc	1800
gcagcagcaa gcacaagggt gccaaagctt ttcaccaaag caagggtag ggtcgttgta	1860
ctaccogagt ggagcttata cacaacagaa accagggcaa ggtacaacc cagggtggaac	1920
ttctccgctg caccagcaag ggggagggtt cggcggcggg ttaacgacgg agcaaccgca	1980

```

gggaggaaag cagccattcc attgccagca aaccactgtc tcccctcacc agggtcagca      2040
aaccactgtc tcccctcatc agggtcagca aaccactgtc tcccctcatc agggtcagca      2100
aaccactgtc tcccctcacc agggtcagca aaccactgtc tcccctcatc cgggtcagca      2160
aaccactgtc tcccctcatc agggtcagca aaccactgtc tcccctcatc cgggtcagca      2220
aaccaccgtc tcccctcatc agggtcagca aaccaccgtc tcccctcatc agggtcagca      2280
aaccaccgtc tcccctcacc agggtcagca gcccggcgag cagccttgcg gtttccctgg      2340
ccagcaaacc accgtgtctc tgcaccatgg tcagcagtcc aacgagttgt actacggcag      2400
cccataccat gttagcgtgg agcagccgtc ggccagccta aaggtagcaa aggcgcagca      2460
gctcgcggca cagctgccgg caatgtgtcg gctggagggc ggcggcggcc tgttggccag      2520
ccagtagtag aactctggca gctcgcattg tgcttgggca tgcattgcacc ttagctatac      2580
aataaacgtg acgtgtgctt gcagtttttc atgtaactag ggtaaaaccc aacaataatg      2640
caaaacggaa agcttctcca tccaaaaaaa gaacaaaact ggtgctatat atagtatgcg      2700
ctacatgtct cagctcattg tcag                                           2724

```

<210> 74

<211> 747

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 74

```

Met Ala Lys Arg Leu Val Leu Phe Val Ala Val Ile Val Ala Leu Val
1              5              10              15

Ala Leu Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Asn Gly Asn Asn Ile Phe Leu
20              25              30

Asp Ser Arg Ser Arg Gln Leu Gln Cys Glu Arg Glu Leu Gln Glu Ser
35              40              45

Ser Leu Glu Ala Cys Arg Arg Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln
50              55              60

Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg
65              70              75              80

Asp Val Ser Pro Glu Cys Arg Pro Val Ala Leu Ser Gln Val Val Arg
85              90              95

Gln Tyr Glu Gln Gln Thr Glu Val Pro Ser Lys Gly Gly Ser Phe Tyr
100             105             110

Pro Gly Gly Thr Ala Pro Pro Leu Gln Gln Gly Gly Trp Trp Gly Thr
115             120             125

Ser Val Lys Trp Tyr Tyr Pro Asp Gln Thr Ser Ser Gln Gln Ser Trp

```

130					135					140					
Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	His	Gln	Ser	Val	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Pro
145					150					155					160
Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Ser	Tyr	Pro	Gly	Ser	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln
				165					170					175	
Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Arg	Gln	Pro	Trp	Ser	Tyr	Pro
			180					185					190		
Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly
		195						200				205			
Tyr	Tyr	Pro	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln
	210					215					220				
Gly	Pro	Tyr	Gln	Ser	Ala	Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln
225					230					235					240
Gly	His	Gln	Glu	Thr	Tyr	Gln	Phe	Ala	Thr	Ser	Pro	His	Gln	Pro	Gly
				245					250					255	
Gln	Trp	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Val
			260					265					270		
Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser	Thr
		275					280					285			
Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln
	290					295					300				
Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Ala	Thr	Phe	Pro	Gln
305					310					315					320
Gln	Pro	Gly	Gln	Trp	Gln	Gln	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro
				325					330					335	
Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	Asn	Pro	Ser	Gly	Thr	Ser
			340					345					350		
Thr	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Val	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly
		355					360					365			
Tyr	Tyr	Pro	Ile	Ala	Thr	Ser	Pro	Gln	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln
	370					375					380				
Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Pro	Gly	His	Gly	Gln	Gln	Leu	Val	Gln	Gly
385					390					395					400
Gln	Gln	Gln	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	His	Tyr	Pro	Ser	Met	Thr	Ser
				405					410					415	
Pro	His	Gln	Thr	Gly	Gln	Gly	Gln	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Pro	Ser	Ala	Ile
			420					425					430		
Ser	Pro	Gln	Gln	Ser	Gly	Gln	Gly	Gln	Gln	Gly	Tyr	Gln	Pro	Ser	Gly
				435			440					445			

Ala Ser Ser Gln Gly Ser Val Gln Gly Ala Cys Gln His Ser Thr Ser
 450 455 460
 Ser Pro Gln Gln Gln Ala Gln Gly Cys Gln Ala Ser Ser Pro Lys Gln
 465 470 475 480
 Gly Leu Gly Ser Leu Tyr Tyr Pro Ser Gly Ala Tyr Thr Gln Gln Lys
 485 490 495
 Pro Gly Gln Gly Tyr Asn Pro Gly Gly Thr Ser Pro Leu His Gln Gln
 500 505 510
 Gly Gly Gly Phe Gly Gly Gly Leu Thr Thr Glu Gln Pro Gln Gly Gly
 515 520 525
 Lys Gln Pro Phe His Cys Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly
 530 535 540
 Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser
 545 550 555 560
 Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln
 565 570 575
 Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His
 580 585 590
 Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Pro Gly Gln Gln Thr Thr
 595 600 605
 Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Pro Gly
 610 615 620
 Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser
 625 630 635 640
 Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln
 645 650 655
 Thr Thr Val Ser Pro His Gln Gly Gln Gln Thr Thr Val Ser Pro His
 660 665 670
 Gln Gly Gln Gln Pro Gly Glu Gln Pro Cys Gly Phe Pro Gly Gln Gln
 675 680 685
 Thr Thr Val Ser Leu His His Gly Gln Gln Ser Asn Glu Leu Tyr Tyr
 690 695 700
 Gly Ser Pro Tyr His Val Ser Val Glu Gln Pro Ser Ala Ser Leu Lys
 705 710 715 720
 Val Ala Lys Ala Gln Gln Leu Ala Ala Gln Leu Pro Ala Met Cys Arg
 725 730 735
 Leu Glu Gly Gly Gly Gly Leu Leu Ala Ser Gln
 740 745

<210> 75
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 75

```

Met Ala Lys Arg Leu Val Leu Phe Val Ala Val Ile Val Ala Leu Val
1          5          10          15

Ala Leu Thr Thr Ala Glu Pro Glu Ile Asn Gly Asn Asn Ile Phe Leu
20          25          30

Asp Ser Arg Ser Gly Gln Leu Gln Cys Glu Arg Glu Leu Gln Glu Ser
35          40          45

Ser Leu Glu Ala Cys Arg Arg Val Val Asp Gln Gln Leu Val Gly Gln
50          55          60

Leu Pro Trp Ser Thr Gly Leu Gln Met Gln Cys Cys Gln Gln Leu Arg
65          70          75          80

Asp Val Ser Pro Glu Cys Arg Pro Val Ala Leu Ser Gln Val Val Arg
85          90          95

Gln Tyr Glu Gln Gln Thr Glu Val Pro Ser Lys Gly Gly Ser Phe Tyr
100         105         110

Pro Gly Gly Thr Ala Pro Pro Leu Gln Gln Gly Gly Trp Trp Gly Thr
115         120         125

Ser Val Lys Trp Tyr Tyr Pro Asp Gln Thr Ser Ser Gln Gln Ser Trp
130         135         140

Gln Gly Gln Gln Gly
145

```

<210> 76
 <211> 2244
 <212> ADN
 <213> Hordeum vulgare

<400> 76

```

atggctaagc ggctggtcct ctttgtggcg gtaatcgtcg ccctcgtggc tctcaccacc      60
gctgaacgtg agatcaatgg gaacaacatt ttccttgata gccgctctag gcagctacag      120
tgtgagcgcg agctccagga gagctcgctc gaggcgtgcc ggcgggtcgt ggaccaacag      180
ctggttggcc agctgccatg gagcacgggg ctccagatgc agtgctgcca gcagcttcgg      240
gacgtcagcc ccgagtgccg ccccgtcgcc ctccagccagg tcgtgaggca atacgagcag      300
caaaccgagg tgccatccaa gggaggatcc ttctacccgg gcgggaccgc accgccgctg      360
cagcaaggag gatggtgggg aacctctgta aaatggtact acccagacca aacttcttcg      420
caacagtcac ggcaagggca acaagggtag caccaaagcg taacttcttc ccagcagcca      480

```

ggacaagggc agcaagggtc ctaccaggt tcaactttcc cgcagcagcc aggacaagga	540
caacaaccag gacagaggca gccatggtcc tatccaagtg caactttccc acaacagcca	600
gggcaagggc aagggaaca aggggtactac ccaggcgcaa cttccctgct gcagccagga	660
caagggaac aagggccta ccagagtga acttctccac agcagccagg acaaggacag	720
ggacaccaag agacctatca atttgcaact tccccgcata agccaggaca atggcaacaa	780
ccaggacaag ggcaacaagg gtactacca agtgttaactt ctccacaaca gtcgggacaa	840
gggcaaacag ggtaccaag tacaacttct ccacaacaat cggggcaagg gcaacagctg	900
ggacaagggc aacaaccagg acaaggga caagggtacc caagtgaac ttttccacaa	960
cagccaggac aatggcaaca agggtcctac ccaagtacaa cttctccgca gcagtcagga	1020
caagggaac aagggtacaa cccaagtga acttctacgc agcagccggg acaagtgaac	1080
cagttgggac aagggaaca aggggtactac ccaattgcaa cttctccgca gcagccagga	1140
caagggaac agctaggaca agggcaacaa ccaggacatg ggcaacagct agtgcaagg	1200
caacaacaag gacaaggga acaaggacac tacccaagta tgacttctcc gcaccaaaca	1260
ggacaagggc aaaaaggata ctaccaagt gcaatttctc cgcagcagtc aggacaagga	1320
caacaaggat accagcctag tggagcttct tcacaggggt cggtgcaagg ggcgtgccag	1380
cacagcacat cttctccgca gcagcaagca caagggtgcc aagcttcttc accaaagcaa	1440
gggctagggc cgttggtacta cccgagtga gcttatacac aacagaaacc agggcaagg	1500
tacaaccag gtggaacttc tccgtgcac cagcaagggg gagggttcgg cggcgggtta	1560
acgacggagc aaccgcagg aggaaagcag ccattccatt gccagcaaac cactgtctcc	1620
cctcaccagg gtcagcaaac cactgtttcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc	1680
cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc cctcaccagg gtcagcaaac caccgtctcc	1740
cctcaccagg gtcagcaaac caccgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc	1800
cctcatccgg gtcagcaaac cactgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc	1860
cctcatccgg gtcagcaaac cactgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac cactgtctcc	1920
cctcatcagg gtcagcaaac caccgtctcc cctcatcagg gtcagcaaac caccgtctcc	1980
cctcatcagg gtcagcaaac caccgtctcc cctcatcagg gtcagcagcc cggcgagcag	2040
ccttgcggtt tccctggcca gcaaaccacc gtgtctctgc accatggtca gcagtccaac	2100
gagttgtact acggcagccc ataccatgtt agcgtggagc agccgtcggc cagcctaaag	2160
gtagcaaagg cgcagcagct cgcggcgag ctgccggcaa tgtgtcgggt ggaggcgggc	2220

ggcggcctgt tggccagcca gtag

2244

<210> 77

<211> 450

<212> ADN

<213> Hordeum vulgare

<400> 77

atggctaagc ggctggtcct ctttgtggcg gtaatcgtcg ccctcgtggc tctcaccacc 60

gctgaacctg agatcaatgg gaacaacatt ttccttgata gccgctctgg gcagctacag 120

tgtgagcgcg agctccagga gagctcgctc gaggcgtgcc ggcgggtcgt ggaccaacag 180

ctggttggcc agctgccatg gagcacgggg ctccagatgc agtgctgcca gcagcttcgg 240

gacgtcagcc ccgagtgccg ccccgtcgcc ctcagccagg tcgtgaggca atacgagcag 300

caaaccgagg tgccatccaa gggaggatcc ttctaccggg gcgggaccgc accgccgctg 360

cagcaaggag gatggtgggg aacctctgta aaatggtact acccagacca aacttcttcg 420

caacagtcac ggcaagggca acaagggtag 450

<210> 78

<211> 181

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 78

Leu	Ala	Cys	Glu	Val	Leu	Lys	Glu	Arg	Ser	Val	Cys	Ile	Leu	Gln	Leu
1				5					10					15	

His	Tyr	Val	Gln	Pro	Ser	Ile	Leu	Gln	Gln	Leu	Asn	Pro	Cys	Lys	Val
			20					25					30		

Phe	Leu	Gln	Gln	Gln	Cys	Ser	Pro	Val	Arg	Met	Pro	Gln	Leu	Ile	Ala
		35					40					45			

Arg	Ser	Gln	Met	Leu	Gln	Gln	Ser	Ser	Cys	His	Val	Leu	Gln	Gln	Gln
	50					55					60				

Cys	Cys	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Ile	Pro	Glu	Gln	Phe	Arg	His	Glu	Ala
65					70					75					80

Ile	Arg	Ala	Ile	Val	Tyr	Ser	Ile	Phe	Leu	Gln	Glu	Gln	Pro	Gln	Gln
			85					90						95	

Ser	Val	Gln	Gly	Ala	Ser	Gln	Pro	Gln	Gln	Gln	Leu	Gln	Glu	Glu	Gln
			100					105					110		

Val	Gly	Gln	Cys	Tyr	Phe	Gln	Gln	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln
		115					120					125			

Pro	Gln	Gln	Val	Pro	Gln	Ser	Val	Phe	Leu	Gln	Pro	His	Gln	Ile	Ala
						135					140				

Gln Leu Glu Ala Thr Asn Ser Ile Ala Leu Arg Thr Leu Pro Thr Met
 145 150 155 160

Cys Asn Val Asn Val Pro Leu Tyr Asp Ile Met Pro Phe Gly Val Gly
 165 170 175

Thr Arg Val Gly Val
 180

<210> 79
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 79

Met Lys Thr Phe Leu Ile Phe Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ala Thr Asn
 1 5 10 15

Thr Ile Ala Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro
 20 25 30

Gln Gln Pro Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln Gln Pro
 35 40 45

Phe Pro Gln Gln Pro Pro Phe Trp Trp Gln Gln Pro Val Gln Ser Gln
 50 55 60

Gln Gln Pro Cys Gln Gln Gln Thr Pro Leu Pro Gln Gly Gln Gln
 65 70 75 80

Tyr Gln Pro Leu Leu Gln Gln Gln Ile Pro Phe Val His Pro Ser Val
 85 90 95

Leu Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Val Phe Leu Gln Gln Gln Cys Ser
 100 105 110

Pro Val Pro Met Pro Gln Arg Ile Ala Arg Ser Gln Met Leu Gln Gln
 115 120 125

Ser Ser Cys His Val Leu Gln Gln Gln Cys Cys Lys Gln Leu Pro Gln
 130 135 140

Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Glu Ala Ile Arg Ala Ile Ile Tyr Ser
 145 150 155 160

Ile Ile Leu Gln Glu Gln Gln Gln Val Gln Asp Phe Val Gln Pro Gln
 165 170 175

Gln Gln Gln Pro Gln Gln Ser Val Gln Gly Val Ser Gln Ser Gln Gln
 180 185 190

Gln Ser Gln Gln Pro Gln Leu Gly Gln Cys Ser Phe Gln Gln Pro Gln
 195 200 205

Leu Gln Gln Leu Gly Gln Gln Pro Gln Gln Gln Gln Val Pro Leu Trp
 210 215 220

Ala Phe Leu Gln Pro Gln Gln Met Ala Gln Leu Glu Val Met Thr Ser
225 230 235 240

Val Ala Leu Arg Thr Leu Pro Thr Met Cys Asn Val Asn Val Pro Leu
245 250 255

Tyr Gly Ile Thr Thr Ser Val Pro Leu Ser Val Gly Thr Gly Val Gly
260 265 270

Pro Tyr

<210> 80

<211> 347

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> misc_feature

<222> (161)..(161)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 80

Met Lys Thr Phe Leu Thr Phe Val Leu Leu Ala Met Ala Met Ser Ile
1 5 10 15

Val Thr Thr Ala Arg Gln Leu Asn Pro Ser His Gln Glu Leu Gln Ser
20 25 30

Pro Gln Gln Pro Phe Leu Lys Gln Gln Ser Tyr Leu Gln Gln Pro Tyr
35 40 45

Pro Gln Gln Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Pro Phe Pro Thr Pro Gln Gln
50 55 60

Phe Phe Pro Tyr Leu Pro Gln Gln Thr Phe Pro Pro Ser Gln Gln Pro
65 70 75 80

Asn Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Pro Pro
85 90 95

Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Asn Pro Gln Gln Pro Gln
100 105 110

Gln Pro Phe Pro Arg Gln Pro Gln Gln Ile Val Pro Gln Gln Pro Gln
115 120 125

Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Gln
130 135 140

Pro Phe Ser Trp Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Gln Pro Leu Gln Leu
145 150 155 160

Xaa Pro Leu Gln Ala Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro Gln Leu Pro
165 170 175

Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Ile Gly Gln Gln Pro Lys Gln Pro Leu
180 185 190

Leu Gln Gln Pro Gln Gln Thr Ile Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe
195 200 205

Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu
210 215 220

Pro Gln Gln Pro Gln Gln Ile Ile Ser Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe
225 230 235 240

Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Pro Phe Pro Gln
245 250 255

Glu Gln Pro Gln Gln Ala Phe Pro Leu Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro
260 265 270

Glu Glu Ser Glu Gln Ile Ile Thr Gln Gln Pro Phe Pro Leu Gln Pro
275 280 285

Gln Gln Leu Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Leu Pro Gln Pro Gln
290 295 300

Gln Pro Phe Arg Gln Leu Pro Lys Tyr Ile Ile Pro Gln Gln Pro Gln
305 310 315 320

Gln Pro Phe Leu Leu Gln Pro His Gln Pro Gln Gln Pro Tyr Ala Gln
325 330 335

Gln Asp Ile Trp Ser Asp Ile Ala Leu Leu Gly
340 345

<210> 81

<211> 305

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 81

Met Lys Ile Leu Ile Ile Leu Thr Ile Leu Ala Met Ala Thr Thr Phe
1 5 10 15

Ala Thr Ser Glu Met Gln Val Asn Pro Ser Val Gln Val Gln Pro Thr
20 25 30

Gln Gln Gln Pro Tyr Pro Glu Ser Gln Gln Pro Phe Ile Ser Gln Ser
35 40 45

Gln Gln Gln Phe Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln
50 55 60

Gln Pro Phe Pro Gln Ser Gln Gln Gln Cys Leu Gln Gln Pro Gln His
65 70 75 80

Gln Phe Pro Gln Pro Thr Gln Gln Phe Pro Gln Arg Pro Leu Leu Pro
85 90 95

Phe Thr His Pro Phe Leu Thr Phe Pro Asp Gln Leu Leu Pro Gln Pro
100 105 110

Pro His Gln Ser Phe Pro Gln Pro Pro Gln Ser Tyr Pro Gln Pro Pro
115 120 125

Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Pro Gln Gln Lys Tyr Pro Glu Gln Pro
130 135 140

Gln Gln Pro Phe Pro Trp Gln Gln Pro Thr Ile Gln Leu Tyr Leu Gln
145 150 155 160

Gln Gln Leu Asn Pro Cys Lys Glu Phe Leu Leu Gln Gln Cys Arg Pro
165 170 175

Val Ser Leu Leu Ser Tyr Ile Trp Ser Lys Ile Val Gln Gln Ser Ser
180 185 190

Cys Arg Val Met Gln Gln Gln Cys Cys Leu Gln Leu Ala Gln Ile Pro
195 200 205

Glu Gln Tyr Lys Cys Thr Ala Ile Asp Ser Ile Val His Ala Ile Phe
210 215 220

Met Gln Gln Gly Gln Arg Gln Gly Val Gln Ile Val Gln Gln Gln Pro
225 230 235 240

Gln Pro Gln Gln Val Gly Gln Cys Val Leu Val Gln Gly Gln Gly Val
245 250 255

Val Gln Pro Gln Gln Leu Ala Gln Met Glu Ala Ile Arg Thr Leu Val
260 265 270

Leu Gln Ser Val Pro Ser Met Cys Asn Phe Asn Val Pro Pro Asn Cys
275 280 285

Ser Thr Ile Lys Ala Pro Phe Val Gly Val Val Thr Gly Val Gly Gly
290 295 300

Gln
305

<210> 82

<211> 255

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 82

Met Gln Val Asn Pro Ser Val Gln Val Gln Pro Thr Gln Gln Gln Pro
1 5 10 15

Tyr Pro Glu Ser Gln Gln Pro Phe Ile Ser Gln Ser Gln Gln Gln Phe
20 25 30

Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Arg Pro Leu Leu Pro Phe Thr
35 40 45

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

<210> 83
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 83

Ile Thr Thr Thr Thr Met Gln Phe Asn Pro Ser Gly Leu Glu Leu Glu
 1 5 10 15
 Arg Pro Gln Gln Leu Phe Pro Gln Trp Gln Pro Leu Pro Gln Gln Pro
 20 25 30
 Pro Phe Leu Gln Gln Glu Pro Glu Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Gln Pro
 35 40 45
 Leu Pro Gln Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Leu Pro His Gln
 50 55 60

His Gln Phe Pro Gln Gln Leu Pro Gln Gln Gln Phe Pro Gln Gln Met
 65 70 75 80
 Pro Leu Gln Pro Gln Gln Gln Phe Pro Gln Gln Met Pro Leu Gln Pro
 85 90 95
 Gln Gln Gln Pro Gln Phe Pro Gln Gln Lys Pro Phe Gly Gln Tyr Gln
 100 105 110
 Gln Pro Leu Thr Gln Gln Pro Tyr Pro Gln Gln Gln Pro Leu Ala Gln
 115 120 125
 Gln Gln Pro Ser Ile Glu Glu Gln His Gln Leu Asn Leu Cys Lys Glu
 130 135 140
 Phe Leu Leu Gln Gln Cys Thr Leu Asp Glu Lys Val Pro Leu Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Val Ile Ser Phe Leu Arg Pro His Ile Ser Gln Gln Asn Ser Cys
 165 170 175
 Gln Leu Lys Arg Gln Gln Cys Cys Gln Gln Leu Ala Asn Ile Asn Glu
 180 185 190
 Gln Ser Arg Cys Pro Ala Ile Gln Thr Ile Val His Ala Ile Val Met
 195 200 205
 Gln Gln Gln Val Gln Gln Gln Val Gly His Gly Phe Val Gln Ser Gln
 210 215 220
 Leu Gln Gln Leu Gly Gln Gly Met Pro Ile Gln Leu Gln Gln Gln Pro
 225 230 235 240
 Gly Gln Ala Phe Val Leu Pro Gln Gln Gln Ala Gln Phe Lys Val Val
 245 250 255
 Gly Ser Leu Val Ile Gln Thr Leu Pro Met Leu Cys Asn Val His Val
 260 265 270
 Pro Pro Tyr Cys Ser Pro Phe Gly Ser Met Ala Thr Gly Ser Gly Gly
 275 280 285

Gln

<210> 84
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 84

Met Lys Thr Met Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ala Phe Ala Ala Thr Ser
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Gln Leu Asp Thr Thr Cys Ser Gln Gly Tyr Gly Gln Cys
 20 25 30

Gln Gln Gln Pro Gln Gln Gln Met Asn Thr Cys Ala Ala Phe Leu Gln
 35 40 45

Gln Cys Ser Arg Thr Pro Tyr Val Gln Ser Gln Met Trp Gln Ala Ser
 50 55 60

Gly Cys Gln Leu Met Arg Gln Gln Cys Cys Gln Pro Leu Ala Gln Ile
 65 70 75 80

Ser Glu Gln Ala Arg Cys Gln Ala Val Cys Ser Met Ala Gln Val Ile
 85 90 95

Met Arg Gln Gln Gln Gly Gln Ser Phe Thr Gln Pro Gln Gln Gln Gln
 100 105 110

Ser Gln Ser Phe Gly Gln Pro Gln Gln Gln Val Pro Val Glu Val Met
 115 120 125

Arg Met Val Leu Gln Thr Leu Pro Ser Met Cys Ser Val Asn Ile Pro
 130 135 140

Gln Tyr Cys Thr Thr Thr Pro Cys Ser Thr Ile Thr Pro Thr Ile Tyr
 145 150 155 160

Ser Ile Pro Met Ala Ala Thr Cys Ala Gly Gly Val Cys
 165 170

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 85

Ala Gln Gln Leu Ala Ala Gln Leu Pro Ala Met Cys Arg
 1 5 10