



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

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

(11)



1-0035763

(51)⁷ A01H 5/00; C12N 15/82; C12N 5/10;
C12N 15/53

(13) B

(21) 1-2017-03239

(22) 02/02/2016

(86) PCT/CN2016/073182 02/02/2016

(87) WO/2016/127867 18/08/2016

(30) 201510078810.3 13/02/2015 CN

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/01/2018 358A

(73) 1. BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD. (CN)
NO. 14 FLOOR, NO. 27 ZHONGGUANCUN STREET, HAIDIAN DISTRICT,
BEIJING 100080 China

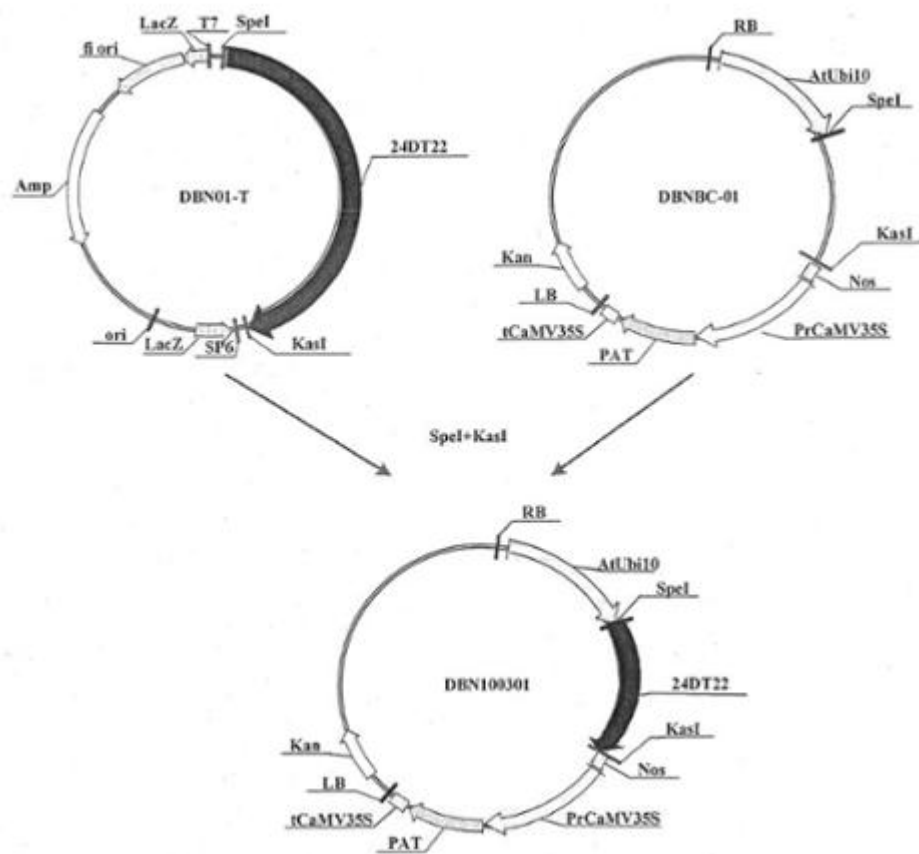
2. BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (CN)
NO. 49 BUILDING, INSTITUTE FOR APPLICATION OF ATOMIC ENERGY,
CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES, NO.2
YUANMINGYUAN WEST ROAD, HAIDIAN DISTRICT, Beijing 100193, China

(72) TAO, Qing (CN); WU, Yechun (CN); PANG, Jie (CN); NIU, Xiaoguang (CN); XIE,
Xiangting (CN); BAO, Xiaoming (CN).

(74) Công ty Luật TNHH Tư vấn Quốc tế (INDOCHINE COUNSEL)

(54) PROTEIN KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ, GEN MÃ HÓA, PHƯƠNG PHÁP BẢO VỆ
THỰC VẬT KHỎI TÁC HẠI GÂY RA BỞI THUỐC DIỆT CỎ

(57) Sáng chế này đề xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa, phương pháp sản xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, và phương pháp tạo cho thực vật hoặc tế bào thực vật tính chống chịu thuốc diệt cỏ. Protein kháng thuốc diệt cỏ bao gồm: (a) protein bao gồm một trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2; hoặc (b) protein có hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ được dẫn xuất từ trình tự axit amin tại (a) bằng việc thay thế và/ hoặc loại bỏ và/ hoặc bổ sung một hoặc nhiều axit amin của trình tự axit amin tại (a). Protein kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế này đặc biệt thích hợp để biểu hiện ở cây trồng, có phạm vi kháng rộng đối với thuốc diệt cỏ, đặc biệt là đối với thuốc diệt cỏ phenoxy auxin.



Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này đề xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa, phương pháp sản xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, và phương pháp tạo cho thực vật hoặc tế bào thực vật tính chống chịu thuốc diệt cỏ, cụ thể là protein kháng 2,4-D, gen mã hóa, phương pháp sản xuất protein như vậy, và phương pháp tạo cho thực vật hoặc tế bào thực vật tính chống chịu thuốc diệt cỏ bằng cách ứng dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cỏ dại có thể nhanh chóng rút cạn các chất dinh dưỡng trong đất mà các chất dinh dưỡng đó cần thiết cho sự phát triển của cây trồng và các cây mục tiêu khác. Hiện nay, có rất nhiều loại thuốc diệt cỏ để kiểm soát cỏ dại, trong đó có loại thuốc diệt cỏ được biết đến một cách rộng rãi là glyphosat. Các cây trồng kháng glyphosat đã được phát triển như ngô, đậu nành, bông, củ cải, lúa mì, và lúa, và các loại cây trồng tương tự. Do đó, có thể phun thuốc glyphosat trên các khu vực gieo trồng loại cây kháng glyphosat để kiểm soát cỏ dại mà không gây hại đáng kể cho cây trồng.

Glyphosat đã được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới trong hơn 20 năm, dẫn đến sự phụ thuộc quá mức vào công nghệ glyphosat và cây trồng chống chịu glyphosat. Ngoài ra, các loại thực vật có khả năng chống chịu glyphosate tự nhiên hơn trong số các loài cỏ dại hoang dã hoặc những cây đã phát triển tính kháng hoạt tính của glyphosate bắt buộc phải chịu áp lực cao về tính chọn lọc. Đã có báo

cáo về một số loài cỏ dại đã phát triển khả năng kháng glyphosat, bao gồm các loài cỏ lá rộng và các loài cỏ khác như cỏ rơm Thụy Sĩ (*Swiss ryegrass*), Cỏ họ Hòa thảo (*Lolium multiflorum*), Mần trâu (*Eleusine indica*), Cỏ chi phần hương (*Ambrosia artemisiifolia*), Ngải dại (*Conyza canadensis*), Cúc lông dại (*Conyza bonariensis*) và Mã đề (*Plantago lanceolata*). Ngoài ra, các loài cỏ dại mà từng không phải là vấn đề đối với nông nghiệp trước khi sử dụng rộng rãi cây chống chịu glyphosat nay cũng dần dần lan rộng, và rất khó kiểm soát được bằng cây trồng chống chịu glyphosat. Những loài cỏ dại này tồn tại chủ yếu (nhưng không phải chỉ) cùng với các loài cỏ lá rộng mà các loài cỏ lá rộng này rất khó được kiểm soát, chẳng hạn như các loài từ Sâm nam (*Amaranthus*), Rau muối (*Chenopodium*), Bồ công anh (*Taraxacum*) và Thài lài (*Commelinaceae*).

Trong phạm vi các loại cỏ dại kháng glyphosat hoặc các loài cỏ dại khó kiểm soát khác, người trồng có thể khắc phục điểm yếu của glyphosat bằng hỗn hợp thuốc diệt cỏ phối trộn trong thùng khuấy hoặc sử dụng thuốc diệt cỏ khác mà có khả năng kiểm soát các loại cỏ dại còn sót lại. Trong hầu hết các trường hợp, loại thuốc diệt cỏ phối trộn trong thùng khuấy phổ biến và hiệu quả được sử dụng để kiểm soát loài cỏ lá rộng là 2,4-điclophenoxyaxetic axit (2,4-D). 2,4-D đã được sử dụng để kiểm soát các loài cỏ lá rộng phổ biến trong hơn 65 năm cho cây gieo trồng và cây không gieo trồng, và vẫn là một trong những loại thuốc diệt cỏ được sử dụng rộng rãi nhất trên thế giới. Hạn chế đối với việc sử dụng rộng rãi 2,4-D nằm ở tính chọn lọc của nó đối với các loài thực vật có hai lá mầm (như đậu nành hoặc bông) là rất thấp. Vì vậy, 2,4-D thường không được sử dụng trên (và thường là không được sử dụng gần với) các loại thực vật có hai lá mầm nhạy cảm. Ngoài ra, việc sử dụng 2,4-D đối với các loài cỏ họ lúa bị giới hạn ở một mức độ nhất định bởi những đặc tính gây hại tiềm tàng đối với cây trồng. Sự kết hợp của 2,4-D và glyphosat đã được ứng dụng để có một quy trình triệt sinh mạnh hơn trước khi gieo trồng đậu nành và bông theo phương pháp không cày xới. Tuy nhiên, do sự nhạy cảm của các loài thực vật hai lá mầm này

đối với 2,4-D, quy trình triệt sinh này phải được thực hiện từ 14 đến 30 ngày trước khi gieo trồng.

Tương tự như MCPA, 2-metyl-4-cloropropionic axit và 2,4-D propionic axit, 2,4-De cũng là một loại thuốc diệt cỏ phenoxy alkanoic axit. 2,4-D được sử dụng để kiểm soát một cách có chọn lọc các loài cỏ lá rộng trong nhiều loại cây trồng có một lá mầm như ngô, lúa mì và lúa mà không gây hại nghiêm trọng cho cây trồng mục tiêu. 2,4-D là dẫn xuất auxin tổng hợp, mà có chức năng làm rối loạn cân bằng hoóc-môn tế bào bình thường và cản trở sự cân bằng của quá trình tăng trưởng được kiểm soát.

2,4-D thể hiện các mức độ chọn lọc khác nhau trên một số loài cây trồng nhất định (ví dụ các thực vật có hai lá mầm thì nhạy cảm hơn các loài cây thuộc họ lúa). Sự chuyển hóa 2,4-D khác nhau ở những loài cây khác nhau là một cách giải thích cho các mức độ chọn lọc khác nhau. Cây trồng thường chuyển hóa 2, 4-D một cách chậm chạp. Vì vậy, các hoạt động khác nhau của các điểm mục tiêu có lẽ là khả năng để giải thích cho các đáp ứng khác nhau với 2, 4-D của cây trồng. Sự chuyển hoá 2, 4-D của cây trồng thường đạt được thông qua hai bước chuyển hoá, cụ thể là kết hợp với các axit amin hoặc glucoza sau khi hydroxyl hóa nói chung.

Thời gian qua đi, các quần thể vi khuẩn đã dần dần phát triển các quá trình hiệu quả, mang tính thay thế để làm thoái biến chất ngoại lai cụ thể này, điều này dẫn đến sự khoáng hóa hoàn toàn 2,4-D. Có thể sử dụng các thuốc diệt cỏ liên tiếp trên vi khuẩn để lựa chọn các vi sinh vật mà chúng sử dụng thuốc diệt cỏ làm nguồn cacbon để tạo ra lợi thế cạnh tranh trong đất. Vì lý do này, đã tạo ra công thức 2,4-D có thời gian bán hủy trong đất tương đối ngắn và không có ảnh hưởng kế thừa rõ ràng đối với các mùa vụ tiếp theo, điều này thúc đẩy việc sử dụng thuốc diệt cỏ 2,4-D.

Vì khuẩn *Ralstonia eutropha* là sinh vật mà khả năng làm thoái biến 2,4-D đã được nghiên cứu rộng rãi. Loại gen mã hoá enzym trong bước enzym hóa đầu tiên của quá trình khoáng hoá là *tfdA*. *TfdA* xúc tiến sự chuyển hóa 2,4-D axit thành điclorophenol (DCP) thông qua phản ứng dioxygenaza phụ thuộc α -oxoglutarat. DCP hầu như không có hoạt tính diệt cỏ khi so sánh với 2,4-D. *TfdA* được sử dụng để đưa tính kháng 2,4-D vào cây có hai lá mầm, là những loại cây thường nhạy cảm với 2, 4-D (chẳng hạn như cây bông và cây thuốc lá) trong cây trồng chuyển đổi gen.

Một số gen kiểu *tfdA* đã được xác định rằng gen này mã hoá các protein có khả năng làm thoái biến 2,4-D trong môi trường. Nhiều chất đồng đẳng là tương tự với *tfdA* (độ đồng nhất axit amin > 85%) và có hoạt tính enzym tương tự với *tfdA*. Tuy nhiên, không phải tất cả các protein đều có cấu trúc như *TauD* mà nó có chức năng làm thoái biến 2,4-D, và một số lượng lớn các chất đồng đẳng có độ đồng nhất thấp hơn một cách đáng kể (25-50%) với *tfdA* trong khi lại có chứa các gốc đặc trưng liên quan đến các dioxygenaza Fe^{2+} dioxygenaza phụ thuộc α -oxoglutarat. Do đó, các đặc trưng chất nền của các dioxygenaza khác nhau này là không xác định. Chỉ một trường hợp duy nhất mà có độ tương đồng thấp (độ đồng nhất axit amin 28%) với *tfdA* là *rdpA* từ vi khuẩn *Sphingobium herbicidovorans*. Đã cho thấy rằng enzym này xúc tiến bước đầu tiên trong quá trình khoáng hóa (R)-2,4-D propionic axit (và propionic (R)-phenoxy axit khác) và 2, 4-D (phenoxyacetic axit).

Với sự xuất hiện của các loại cỏ kháng glyphosat và ứng dụng mở rộng của thuốc diệt cỏ 2,4-D, cần thiết phải đưa tính kháng 2,4-D vào các cây trồng mục tiêu nhạy cảm với 2,4-D. Ở thời điểm hiện tại, không có báo cáo nào về việc phát hiện về mức độ biểu hiện của protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 trong cây trồng và sự chống chịu thuốc diệt cỏ của chúng.

Mô tả tóm tắt sáng chế

Mục đích của sáng chế này là đề xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng của chúng. Sáng chế này cũng đề xuất gen 24DT22 mới có tính chống chịu thuốc diệt cỏ cao hơn trong cây trồng.

Để có thể đạt được mục đích nói trên, protein kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế này, bao gồm:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin được trình bày tại SEQ ID NO: 2; hoặc

(b) protein có hoạt tính của aryloxy alkanoat di-oxygenaza dẫn xuất từ trình tự axit amin tại (a) bằng cách thay thế và/ hoặc loại bỏ và/ hoặc bổ sung một hoặc vài axit amin vào trình tự axit amin tại (a).

Để đạt được mục đích nêu trên, gen kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế này bao gồm:

(a) trình tự nucleotit mã hoá protein kháng thuốc diệt cỏ nói trên; hoặc

(b) trình tự nucleotit có khả năng lai tạo với trình tự nucleotit tại (a) trong điều kiện nghiêm ngặt và mã hoá protein bằng hoạt tính aryloxy alkanoat di-oxygenaza; hoặc

(c) trình tự nucleotit được thể hiện theo SEQ ID NO:1.

Điều kiện nghiêm ngặt có thể được kể đến như sau: lai tạo trong 6×SSC (natri nitrat), dung dịch SDS (natri dodecyl sunphat) 0,5% ở 65°C và sau đó là rửa màng một lần sử dụng 2×SSC, SDS 0,1% và 1×SSC, SDS 0,1%, tương ứng.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này cũng đề xuất catxet biểu hiện, bao gồm gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên dưới sự điều chỉnh của trình tự điều hòa được liên kết theo cách thức có khả năng hoạt động.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này cũng đề xuất vector tái tổ hợp, bao gồm gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên hoặc catxet biểu hiện nói trên.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này đề xuất phương pháp sản xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, bao gồm:

thu tế bào của sinh vật chủ biến đổi gen có chứa gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc catxet biểu hiện;

nuôi cấy tế bào của sinh vật chủ biến đổi gen dưới các điều kiện cho phép sản xuất protein kháng thuốc diệt cỏ;

thu hồi protein kháng thuốc diệt cỏ.

Tốt hơn là sinh vật chủ biến đổi gen bao gồm thực vật, động vật, vi khuẩn, nấm men, baculovirus, giun tròn hoặc tảo.

Cũng tốt hơn là cây trồng là đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường hoặc mía.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này cũng đề xuất phương pháp mở rộng phạm vi của thuốc diệt cỏ mục tiêu, bao gồm: đồng biểu hiện nucleotit mã hoá protein kháng thuốc diệt cỏ hoặc protein kháng thuốc diệt cỏ được mã hoá bởi catxet biểu hiện bằng ít nhất một nucleotit thứ hai khác với protein nói trên hoặc protein mã hoá bằng catxet biểu hiện nói trên.

Tốt hơn là nucleotit thứ hai mã hóa protein kháng glyphosat, protein kháng glufosinat-amoni, 4-hydroxyphenylpyruvic axit đioxygenaza, axetolactat syntasa, protein xytocrom hoặc protoporphyrinogen oxidaza.

Theo sáng chế này, protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 được biểu hiện trong cây trồng biến đổi gen cùng với các biểu hiện của một hoặc nhiều protein kháng glufosinat và/ hoặc các protein kháng glufosinat-amoni. Sự đồng biểu hiện của nhiều hơn một loại protein kháng thuốc diệt cỏ trong cùng một cây trồng biến đổi gen có thể đạt được bằng cách biến đổi và biểu hiện các gen liên quan trong cây trồng thông qua kỹ thuật di truyền. Ngoài ra, protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 có thể được thể hiện ở một cây (Cây mẹ 1) thông qua các hoạt động kỹ thuật di truyền và protein kháng glyphosat và/ hoặc protein kháng glufosinat-amoni có thể được thể hiện ở cây thứ hai (Cây mẹ 2) thông qua việc thực hiện kỹ thuật di truyền. Các cây đời con thể hiện tất cả các gen của Cây mẹ 1 và Cây mẹ 2 có thể thu được bằng cách lai chéo giữa Cây mẹ 1 và Cây mẹ 2.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này cũng đề xuất phương pháp lựa chọn các tế bào thực vật được biến đổi, bao gồm các bước biến nạp nhiều tế bào thực vật bằng gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc catxet biểu hiện và nuôi cấy các tế bào nói trên trong một nồng độ thuốc diệt cỏ mà cho phép sự tăng trưởng của các tế bào biến đổi biểu hiện gen kháng thuốc diệt cỏ hoặc catxet biểu hiện trong khi làm chết các tế bào chưa biến đổi hoặc ức chế sự phát triển của các tế bào chưa biến đổi, trong đó thuốc diệt cỏ là một phenoxy auxin.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế cũng đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại, bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều

loại thuốc diệt cỏ trên khu vực gieo trồng cây có chứa gen kháng thuốc diệt cỏ, catxet biểu hiện hoặc vector tái tổ hợp nói trên.

Tốt hơn là thuốc diệt cỏ là một phenoxy auxin.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này cũng đề xuất phương pháp bảo vệ cây trồng khỏi những tác hại gây ra bởi các loại thuốc diệt cỏ, bao gồm bước đưa loại gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên, catxet biểu hiện nói trên hoặc vector tái tổ hợp nói trên vào cây trồng, sao cho cây trồng tạo thành sản sinh ra lượng nhất định protein kháng thuốc diệt cỏ đủ để bảo vệ chúng khỏi những tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ.

Tốt hơn là thuốc diệt cỏ này là phenoxy auxin hoặc aryloxy phenoxy propionat và các cây trồng nói trên được chọn từ nhóm gồm đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường và mía.

Để đạt được mục đích nói trên, sáng chế này cũng đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại kháng glyphosat trong khu vực gieo trồng cây chống chịu glyphosat, bao gồm bước dùng lượng thuốc diệt cỏ hữu hiệu trên khu vực gieo trồng cây chống chịu glyphosat, trong đó các cây có khả năng chống chịu glyphosat nói trên có gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên, catxet biểu hiện nói trên hoặc vector tái tổ hợp nói trên.

Tốt hơn là thuốc diệt cỏ là phenoxy auxin và cây trồng chống chịu glyphosat là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm.

Để đạt được mục đích nêu trên, sáng chế này cũng đề xuất phương pháp tạo cho cây trồng khả năng kháng thuốc diệt cỏ 2,4-D, bao gồm các

bước đưa gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên, catxet biểu hiện nói trên hoặc vector tái tổ hợp nói trên vào cây trồng.

Tốt hơn là các cây trồng nói trên là đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường hoặc mía.

Để đạt được mục đích nói trên, sáng chế này cũng đề xuất protein kháng thuốc diệt cỏ được sử dụng để tạo cho thực vật hoặc tế bào thực vật tính chống chịu thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, mở rộng phạm vi thuốc diệt cỏ mục tiêu, chọn lọc tế bào thực vật biến đổi gen, kiểm soát cỏ dại, bảo vệ thực vật khỏi những tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ phenoxy auxin hoặc để tạo cho thực vật tính chống chịu thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, bao gồm:

(a) protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID NO: 2; hoặc

(b) protein có hoạt tính của aryloxy alkanoat di-oxygenaza được tạo ra từ trình tự axit amin tại (a) bằng cách thay thế và/ hoặc loại bỏ và/ hoặc bổ sung một hoặc nhiều axit amin vào trình tự axit amin tại (a).

Gen kháng thuốc diệt cỏ, catxet biểu hiện nói trên hoặc vector tái tổ hợp nói trên đã được đưa vào cây trồng. Các phương pháp thông thường được sử dụng theo sáng chế này để đưa ADN ngoại lai vào tế bào cây trồng bao gồm nhưng không giới hạn ở phương pháp biến nạp gen gián tiếp qua *Agrobacterium*, phương pháp bắn gen (Particle Bombardment), nạp trực tiếp ADN vào protoplast, kỹ thuật điện di (electroporation) hoặc nhập nội ADN thông qua trung gian silicon.

Gen kháng 2,4-D và các cây trồng kháng thuốc diệt cỏ tạo ra theo sáng chế này tạo ra một sự lựa chọn tốt để kiểm soát các loài cỏ lá rộng kháng glyphosat (hoặc có khả năng chống chịu hoặc kế thừa cao) trong cây trồng.

2,4-D là một loại thuốc diệt cỏ lá rộng mạnh, tương đối rẻ và có phổ rộng. Người trồng có thể có lợi ích tốt nếu cả cây hai lá mầm và cây một lá mầm có thể có độ chống chịu tốt hơn. Cây hai lá mầm biến đổi gen chống chịu 2,4-D cũng có độ linh hoạt cao hơn về thời gian sử dụng và lượng sử dụng. Một tác dụng khác của đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D đó là nó có thể được sử dụng để ngăn ngừa tác hại cho các cây trồng nhạy cảm thông thường, chẳng hạn như rửa trôi, bay hơi, biến đổi (hoặc các hiện tượng thay đổi từ xa khác), dùng sai 2,4-D, tàn phá và các tác hại tương tự. Các hỗn hợp khác nhau của các phenoxy auxin khác nhau đã được sử dụng rộng rãi để xử lý các phổ cỏ dại đặc thù và các điều kiện môi trường ở các khu vực khác nhau. Sử dụng gen 24DT22 trong cây trồng có thể tạo ra sự bảo vệ khỏi thuốc diệt cỏ phenoxy auxin phổ rộng hơn nhằm cải thiện tính linh hoạt và phổ cỏ dại có thể kiểm soát được và tạo ra sự bảo vệ cho phạm vi đầy đủ đối với xu thế phenoxy auxin có sẵn trên thị trường hoặc các tác hại do thuốc diệt cỏ phenoxy auxin từ xa khác.

Các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin thường được điều chế dưới dạng axit hoạt tính, nhưng một số chế phẩm thương mại hóa được điều chế như một trong một số chế phẩm este tương ứng. Bởi vì các esterase thực vật phổ biến có trong cây trồng có thể chuyển hóa các este này thành các axit hoạt tính, chúng cũng được xem như là chất nền của enzym 24DT22 trong cây trồng. Tương tự, chúng cũng có thể là muối hữu cơ hoặc vô cơ của các axit tương ứng. Khi thể hiện, thuốc diệt cỏ axit propionic không đối xứng, muối axit propionic hoặc thuốc diệt cỏ este propionic, ngay cả khi các số CAS khác nhau, đều có thể tương ứng với một hợp chất tinh khiết về quang học. Khi đặt tên các loại thuốc diệt cỏ, vẫn cho rằng đồng phân đối ảnh raxemic (R, S) hoặc đồng phân đối ảnh tinh khiết về quang học (R hoặc S) là cùng một loại thuốc diệt cỏ. Phạm vi liều lượng có thể là liều dùng xử lý riêng lẻ

hoặc kết hợp với các thuốc diệt cỏ khác khi sử dụng cho cây trồng hoặc cây không trồng.

Đã xác định được rằng gen 24DT22 có các đặc tính cho phép sử dụng thuốc diệt cỏ phenoxy auxin trên thực vật sau khi chuyển gen 24DT22 bằng công nghệ biến đổi gen trong cây trồng, mà tính chống chịu vốn có của cây trồng là không tồn tại hoặc không đủ để cho phép sử dụng các thuốc diệt cỏ này. Ngoài ra, gen 24DT22 có thể tạo ra sự bảo vệ trên các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin khi tính chống chịu tự nhiên không đủ để cho phép sự chọn lọc trong cây trồng. Một, hai hoặc một vài thuốc diệt cỏ phenoxy auxin có thể được kết hợp một cách liên tiếp hoặc phối trộn trong thùng khuấy để xử lý cho những cây trồng chỉ chứa gen 24DT22. Phạm vi liều dùng của mỗi loại thuốc diệt cỏ phenoxy auxin được sử dụng để kiểm soát phổ rộng cỏ dại hai lá mầm nằm trong khoảng từ 25 đến 4000 g ae/ha, phổ biến hơn là từ 100 đến 2000 g ae/ha. Việc kết hợp các thuốc diệt cỏ thuộc các nhóm hóa chất khác nhau và có các phương thức tác động khác nhau trong cùng một khu vực (liên tiếp hoặc phối trộn trong thùng khuấy) có thể kiểm soát được hầu hết các loại cỏ dại tiềm tàng mà được kiểm soát có chủ đích bằng thuốc diệt cỏ.

Glyphosat được sử dụng rộng rãi vì nó có phổ kiểm soát rộng đối với các loài cỏ lá rộng và loại cỏ họ lúa. Tuy nhiên, việc sử dụng glyphosat lặp đi lặp lại cho các cây trồng và cây không trồng chống chịu glyphosat đã (và sẽ tiếp tục) dẫn đến kết quả chọn lọc trong thế hệ kế thừa của cỏ thành loài có kiểu hình sinh học có sức chống chịu thuốc diệt cỏ tự nhiên hoặc kháng glyphosat cao hơn. Hầu hết các chiến lược quản lý tình trạng kháng thuốc diệt cỏ đều khuyến nghị sử dụng lượng hữu hiệu các loại thuốc diệt cỏ được phối trộn trong thùng khuấy như là một cách để trì hoãn sự xuất hiện của các chủng loại cỏ dại kháng thuốc. Việc kết hợp các thuốc diệt cỏ tạo ra sự

kiểm soát cùng một loài cỏ dại nhưng với các phương thức tác động khác nhau. Sự che chắn của gen 24DT22 và đặc tính chống chịu glyphosat (và/hoặc các đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ khác) có thể giúp kiểm soát các loài cỏ kháng glyphosat (các loại cỏ lá rộng được kiểm soát bởi một hoặc nhiều phenoxy auxin) trong cây trồng chống chịu glyphosat bằng cách dùng một cách chọn lọc glyphosat và phenoxy auxin (chẳng hạn như 2,4-D) trên cùng loại cây trồng. Việc dùng các thuốc diệt cỏ này có thể là việc sử dụng riêng từng chế phẩm thuốc diệt cỏ trong hỗn hợp trong thùng có hai hoặc nhiều hơn thuốc diệt cỏ có cách thức tác động khác nhau một cách đồng thời hoặc liên tiếp (ví dụ trước khi gieo trồng, trước khi nảy mầm hoặc sau khi nảy mầm) (thời gian cách quãng dao động từ 2 giờ 3 tháng). Ngoài ra, các chế phẩm của bất kể số lượng thuốc diệt cỏ nào đại diện cho mỗi nhóm hợp chất có thể được sử dụng vào bất kỳ lúc nào (từ trong vòng 7 tháng sau khi gieo trồng cho đến thời điểm thu hoạch (hoặc, đối với từng loại thuốc diệt cỏ đơn lẻ, tốt hơn nên có một khoảng thời gian giãn cách trước khi thu hoạch, trong đó là loại thuốc có thời gian giãn cách ngắn nhất sẽ được lựa chọn)).

Tính linh hoạt rất quan trọng trong việc kiểm soát cỏ lá rộng, tức là thời gian sử dụng, liều sử dụng của thuốc diệt cỏ đơn lẻ và khả năng kiểm soát các loại cỏ dại khó diệt hoặc kháng thuốc. Liều glyphosat bao phủ cây có gen kháng glyphosat/ gen 24DT22 có thể dao động từ 250 đến 2500 g ae/ha; liều lượng (một hoặc nhiều) thuốc diệt cỏ phenoxy auxin có thể dao động từ 25 đến 4000 g ae/ha. Sự kết hợp tối ưu về thời gian sử dụng phụ thuộc vào các điều kiện, loài và môi trường cụ thể.

Các công thức thuốc diệt cỏ (chẳng hạn như este, axit hoặc các công thức muối hoặc các nồng độ có thể hòa tan, các nồng độ được nhũ hóa hoặc các dung dịch có thể hòa tan) và các chất phụ gia của hỗn hợp khuấy

trộn trong thùng (chẳng hạn như chất điều chỉnh hoặc phụ gia liên kết) có thể ảnh hưởng đáng kể đến khả năng kiểm soát cỏ dại của một loại thuốc diệt cỏ nhất định hoặc hỗn hợp của một hay nhiều loại thuốc diệt cỏ. Bất kỳ sự kết hợp hóa học nào của bất kỳ loại thuốc diệt cỏ nào nêu trên đều được bao gồm trong phạm vi của sáng chế này.

Như đã được biết rõ bởi người có kiến thức chuyên môn trong lĩnh vực kỹ thuật, những lợi ích của việc kết hợp hai hay nhiều phương thức tác động trong việc cải thiện phổ cỏ dại được kiểm soát và/ hoặc các loài tự nhiên có tính chống chịu cao hơn hoặc các loài cỏ dại có tính kháng thuốc cao hơn có thể được mở rộng tới các hoá chất có thể tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ khác bên cạnh khả năng chống chịu glyphosat của cây trồng bằng phương pháp nhân tạo (biến đổi gen hoặc không biến đổi gen). Thực tế, các đặc tính kháng thuốc sau đây có thể được mã hóa đơn lẻ hoặc được phủ chồng nhiều lần sao cho mang lại khả năng kiểm soát hoặc ngăn ngừa một cách hiệu quả cỏ dại khỏi việc kế thừa bất kỳ loại khả năng kháng thuốc diệt cỏ nào nêu trên: kháng glyphosat (chẳng hạn như các loài cây hoặc vi khuẩn kháng thuốc, EPSPS, GOX, GAT), kháng glufosinat-amoni (chẳng hạn như PAT, Bar), kháng thuốc diệt cỏ ức chế axetolactat syntaza (ALS) (chẳng hạn như imidazolidinon, sulfonilurea, pyrimidin triazol, sulphonanilid, pyrimidin thiobenzoat và các gen kháng hóa chất khác như AHAS, CSRL, SurA, v.v...), kháng bromoxynil (chẳng hạn như Bxn), kháng thuốc ức chế HPPD (4-Hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza), kháng thuốc ức chế phytoen desaturaza (PDS), khả năng kháng thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hợp II (chẳng hạn như psbA), khả năng kháng thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hợp I, kháng thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza IX (PPO) (chẳng hạn như PPO-1), kháng thuốc diệt cỏ phenylurea (chẳng hạn như CYP76B1), enzym làm thoái biến dicamba, v.v...

Đối với các thuốc diệt cỏ khác, một số chất ức chế ALS thích hợp khác bao gồm triazolopyrimidin benzenesulfonamid (cloransulam-metyl, diclosulam, flumetsulam, metosulam và pyrimidino triazol sulfonamid), pyrimidin thiobenzoat và flucarbazon. Một số chất ức chế HPPD thích hợp bao gồm mesotrion, isoxaflutol và sulcotrion. Một số chất ức chế PPO thích hợp bao gồm flumioxazin, butafenaxil, carfentrazone, sulfentrazone và diphenyl oxit (như axifluorfen, fomesafen, lactofen và oxyfluorfen).

Ngoài ra, gen 24DT22 có thể được phủ đơn lẻ bằng một hoặc nhiều loại đặc tính đầu vào khác (chẳng hạn như tính kháng côn trùng, kháng nấm hoặc khả năng chịu được sự khắc nghiệt) hoặc các đặc tính đầu ra (như tăng năng suất, cải thiện lượng dầu, cải thiện chất lượng của chất xơ) hoặc được phủ bằng một hoặc nhiều loại đặc tính đầu vào khác (chẳng hạn như kháng côn trùng, kháng nấm hoặc khả năng chịu được sự thời tiết khắc nghiệt) hoặc các đặc tính đầu ra (như tăng năng suất, cải thiện lượng dầu, cải thiện chất lượng của chất xơ) sau khi được phủ bằng các đặc tính kháng thuốc diệt cỏ khác của cây trồng. Do vậy, sáng chế này có thể cung cấp khả năng kiểm soát một cách linh hoạt và kinh tế bất kỳ số lượng loài gây hại nào và hoàn thiện giải pháp nông nghiệp để cải thiện chất lượng cây trồng.

Gen 24DT22 theo sáng chế này có thể làm thoái biến 2,4-D mà nó là cơ sở của các loại cây trồng kháng thuốc diệt cỏ quan trọng và của khả năng chọn lọc dựa trên chỉ thị phân tử.

Hầu như tất cả sự kết hợp thuốc diệt cỏ đối với cỏ lá rộng đều có thể được kiểm soát bằng biểu hiện biến đổi gen của gen 24DT22. Gen 24DT22, là đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ ưu việt của cây trồng, có thể được phủ bằng, ví dụ, các đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ khác của cây trồng, chẳng hạn như kháng glyphosat, kháng glufosinat-amoni, kháng chất ức chế ALS

(chẳng hạn như imidazolidinon, sulfonyleurea và triazolopyrimidin benzenesulfonamid) kháng bromoxynil, kháng chất ức chế HPPD, kháng chất ức chế PPO và những đặc tính tương tự) và các đặc tính kháng côn trùng (Cry1Ab, Cry1F, Vip3, protein của vi khuẩn bacillus thuringiensis hoặc protein kháng côn trùng được chuyển hóa từ các vi khuẩn không phải là trực khuẩn khác). Ngoài ra, gen 24DT22 có thể được sử dụng như là một chỉ thị phân tử cho việc chọn lọc nhằm hỗ trợ cho việc chọn lọc thể biến nạp sơ cấp của các loại cây trồng được biến đổi gen bằng một gen hoặc một nhóm gen khác.

Nhóm phenoxy alkanoat có thể được sử dụng để nhập nội các nhóm chức năng axit ổn định vào các loại thuốc diệt cỏ. Các nhóm axit có thể được nhập vào hoạt tính libe bằng "bắt axit" (đặc tính cần thiết bởi tác động của thuốc diệt cỏ), sao cho nhóm axit đó được hợp nhất vào các thuốc diệt cỏ mới cho mục đích về hoạt tính. Có rất nhiều loại thuốc diệt cỏ có sẵn trên thị trường và được thử nghiệm làm chất nền của 24DT22. Do vậy, khả năng chống chịu với các loại thuốc diệt cỏ khác có thể đạt được bằng cách sử dụng sáng chế này.

Đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng theo sáng chế này có thể được sử dụng theo cách kết hợp mới với các đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng khác (bao gồm nhưng không giới hạn ở tính chống chịu glyphosat). Bởi vì khả năng kháng thuốc diệt cỏ mới có được hoặc khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ vốn có (chẳng hạn như glyphosat), việc kết hợp các đặc tính này với nhau sẽ tạo nên các phương pháp kiểm soát mới để soát cỏ dại. Chính vì thế, ngoài các đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng, sáng chế này cũng đề xuất những phương pháp mới để kiểm soát

cỏ dại bằng thuốc diệt cỏ, mà trong đó tính chống chịu thuốc diệt cỏ nói trên đạt được thông qua enzym được tạo ra bởi cây trồng biến đổi gen.

Sáng chế này có thể được áp dụng cho nhiều loại thực vật, như cây họ Cải (*Arabidopsis*), thuốc lá, đậu nành, bông, lúa, ngô và cây thuộc họ cải bắp. Sáng chế này cũng có thể được áp dụng cho nhiều loại cây trồng có một lá mầm khác (như cỏ họ lúa (*gramineous herbage*) hoặc cỏ thảm (*grassy carpet*)) và cây trồng có hai lá mầm (như cỏ linh lăng (*alfalfa*)), cỏ ba lá (*clover*) và các loài cây, vân vân). Tương tự, 2, 4-D (hoặc các chất nền của 24DT22 khác) có thể được sử dụng chủ động hơn đối với các loại cây trồng thuộc họ lúa với sức chống chịu vừa phải, và đặc tính chống chịu tạo thành được tăng lên sẽ giúp người trồng có thể sử dụng các loại thuốc diệt cỏ này với liều lượng hữu hiệu hơn và thời gian sử dụng rộng hơn mà vẫn không có nguy cơ gây hại cho cây trồng.

Bộ gen của thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật được mô tả trong sáng chế này đề cập đến bất kỳ vật liệu di truyền nào có trong thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật, và bao gồm hạt nhân, plasmit và bộ gen ty thể.

Tính "kháng" được mô tả trong sáng chế này là tính kháng có thể di truyền, và cho phép cây trồng phát triển và sinh sản trong trường hợp việc xử lý hữu hiệu được áp dụng cho các cây trồng nhất định bằng cách sử dụng thuốc diệt cỏ thông thường. Như đã được biết bởi người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật, ngay cả khi một số tác hại nhất định đối với cây trồng do thuốc diệt cỏ gây ra là hiển nhiên, thì cây trồng vẫn có thể được coi là có tính "kháng". Thuật ngữ "chống chịu" được mô tả trong sáng chế này có nghĩa rộng hơn thuật ngữ "kháng" và bao gồm cả tính "kháng" và khả năng được cải thiện về tính kháng của cây trồng cụ thể đối với nhiều mức độ tác

hại khác nhau do thuốc diệt cỏ gây ra mà nói chung, loại thuốc diệt cỏ này cũng gây ra những tác hại đối với các loại cây hoang dại có cùng kiểu gen với cùng liều dùng thuốc diệt cỏ.

Như được mô tả trong sáng chế này, các polynucleotit và/ hoặc các nucleotit tạo thành "gen" hoàn chỉnh và mã hóa protein hoặc polypeptit trong các tế bào chủ liên quan. Người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật có thể dễ dàng nhận ra rằng các polynucleotit và/ hoặc các nucleotit theo sáng chế này có thể chịu sự kiểm soát của các trình tự điều hòa của tế bào chủ mục tiêu.

Được biết rõ bởi người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật, ADN thường tồn tại dưới dạng trình tự kép. Theo cách bố trí này, một trình tự sẽ có tính bổ sung cho trình tự còn lại, và ngược lại. Khi ADN được sao chép ở thực vật, các trình tự bổ sung khác của ADN cũng được tạo ra. Do đó, các polynucleotit được minh họa trong danh sách trình tự và các trình tự bổ sung của danh sách trình tự đó được bao gồm trong sáng chế này. Các "trình tự mã hóa" thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này đề cập đến trình tự liên kết với trình tự đối ngược. Để biểu hiện một protein trong cơ thể sống, một trình tự ADN thường được phiên mã thành một trình tự bổ sung mARN mà nó đóng vai trò như hình mẫu của biểu hiện protein. Trên thực tế, một mARN được phiên mã từ trình tự ADN "đối ngược". "Trình tự bản năng" hoặc "trình tự mã hoá" có chứa một loạt các codon (codon là một bộ ba nucleotit mã hoá axit amin cụ thể), có thể được đọc như các khung đọc mở (ORF) để tạo ra các protein hoặc các peptit mục tiêu. ARN và APN (axit peptit nucleic) có chức năng tương đương với ADN được minh họa cũng được bao hàm trong sáng chế này.

Phân tử axit nucleic hoặc các đoạn của chúng đã được lai tạo với gen kháng thuốc diệt cỏ trong điều kiện nghiêm ngặt theo sáng chế này. Bất kỳ phương pháp lai tạo hoặc khuếch đại axit nucleic thông thường nào có thể được sử dụng để xác định sự tồn tại của gen kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế này. Các phân tử axit nucleic hoặc các đoạn của chúng có khả năng lai tạo một cách đặc thù với các phân tử axit nucleic khác trong một số điều kiện nhất định. Theo sáng chế này, nếu hai phân tử axit nucleic có thể tạo thành một cấu trúc axit nucleic đối song song với các trình tự kép, thì có thể xác định rằng hai phân tử này có thể lai tạo đặc thù với nhau. Nếu hai phân tử axit nucleic là bổ sung hoàn toàn với nhau thì một trong hai phân tử đó được gọi là "phân tử bổ sung" của phân tử kia. Theo sáng chế này, khi mỗi nucleotit của một phân tử axit nucleic bổ sung cho nucleotit tương ứng của một phân tử axit nucleic khác, sẽ xác định rằng hai phân tử này là "bổ sung hoàn toàn". Nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai tạo với nhau để có thể củng cố và liên kết cùng nhau với đủ độ ổn định ít nhất là trong điều kiện "nghiêm ngặt thấp", thì sẽ xác định hai axit nucleic này là "bổ sung tối thiểu". Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai tạo với nhau để có thể củng cố và liên kết với nhau với đủ độ ổn định trong điều kiện "nghiêm ngặt cao" thông thường, thì sẽ xác định rằng hai axit nucleic này là "bổ sung". Có thể cho phép độ sai lệch của "bổ sung hoàn toàn", trong phạm vi mà độ sai lệch không ngăn cản hoàn toàn việc hai phân tử hình thành một cấu trúc trình tự kép. Một phân tử axit nucleic mà có thể được dùng làm đoạn mồi hoặc đoạn dò phải có các trình tự bổ sung đầy đủ để hình thành một cấu trúc trình tự kép ổn định trong dung môi nhất định ở nồng độ muối cụ thể.

Theo sáng chế này, về cơ bản, trình tự tương đồng đề cập đến phân tử axit nucleic, mà phân tử axit nucleic này có thể lai tạo đặc thù với trình tự bổ sung của một phân tử axit nucleic tương hợp khác trong điều kiện "nghiêm ngặt cao". Các điều kiện nghiêm ngặt để lai tạo ADN được những người có

kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật biết rõ, chẳng hạn như phương pháp xử lý với dung dịch 6.0 x natri clorua/ natri xitrat (SSC) ở khoảng 45°C và rửa bằng 2.0 x SSC ở 50°C. Ví dụ, nồng độ muối trong bước rửa được chọn từ 2,0 x SSC và 50°C đối với điều kiện "nghiêm ngặt thấp" và 0,2 x SSC và 50°C đối với điều kiện "nghiêm ngặt cao". Ngoài ra, nhiệt độ trong bước rửa dao động từ 22°C đối với điều kiện "nghiêm ngặt thấp" đến 65°C đối với điều kiện "nghiêm ngặt cao". Cả hai nhiệt độ và nồng độ muối này có thể thay đổi cùng nhau hoặc chỉ thay đổi một trong hai biến số này. Tốt hơn là điều kiện nghiêm ngặt được sử dụng theo sáng chế này có thể như dưới đây. SEQ ID NO:1 được lai tạo đặc trưng trong 6,0 x SSC và dung dịch SDS 0,5% ở 65°C. Sau đó, màng được rửa một lần trong dung dịch 2 x SSC và SDS 0,1% và dung dịch 1 x SSC và SDS 0,1%, tương ứng.

Do đó, một trình tự kháng thuốc diệt cỏ nhất định có thể lai tạo với SEQ ID NO: 1 trong điều kiện nghiêm ngặt được bao gồm trong sáng chế này. Các trình tự này tương đồng ít nhất khoảng 40% đến 50% hoặc tương đồng khoảng 60%, 65% hoặc 70%, thậm chí tương đồng ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% , 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn so với các trình tự của sáng chế này.

Sáng chế này cũng đề cập đến protein chức năng. "Hoạt tính chức năng" (hoặc "hoạt tính") được mô tả trong sáng chế này có nghĩa là hoạt tính của các protein/ enzym (một mình hoặc kết hợp với các protein khác) theo sáng chế này để làm thoái biến thuốc diệt cỏ hoặc giảm hoạt tính của thuốc diệt cỏ. Tốt hơn là cây trồng mà sản sinh được protein theo sáng chế này sản sinh được lượng hữu hiệu protein mà, khi xử lý cây trồng với thuốc diệt cỏ, mức biểu hiện protein đủ để cung cấp cho cây trồng khả năng kháng hoặc chống chịu hoàn toàn hoặc một phần đối với thuốc diệt cỏ (liều lượng chung nếu có không có chỉ dẫn cụ thể). Thuốc diệt cỏ thường được sử dụng

ở liều lượng có khả năng làm chết các loại cây mục tiêu, với liều lượng và nồng độ thông thường được sử dụng trên khu vực trồng trọt. Tốt hơn là, các tế bào thực vật cũng như các cây trồng đề cập trong sáng chế này được bảo vệ khỏi sự ức chế sự tăng trưởng hoặc tác hại do thuốc diệt cỏ gây ra. Các cây trồng biến đổi gen và các tế bào thực vật được đề cập trong sáng chế này có tính kháng hoặc chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D, điều này có nghĩa rằng cây trồng biến đổi gen và các tế bào thực vật có thể sống sót trong điều kiện có sử dụng lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ 2,4-D.

Gen và protein được mô tả theo sáng chế này bao gồm không chỉ các trình tự điển hình đặc trưng, mà còn bao gồm cả các bộ phận và/ hoặc các đoạn (bao gồm các đoạn bị thiếu hụt trong và/ hoặc các đoạn ở đầu của protein có chiều dài đầy đủ), các biến thể, các đột biến, các thể thay thế (các protein có chứa (các) axit amin bị thay thế), thể khảm (chimera) và protein liên hợp giữ được hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ của chúng. Các "biến thể" hoặc "sự biến đổi" được đề cập trên đây đề cập đến các trình tự nucleotit mã hoá cùng protein hoặc mã hóa protein tương đương có hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ. Các "protein tương đương" được đề cập trên đây đề cập đến các protein có cùng hoặc về cơ bản là cùng hoạt tính sinh học kháng thuốc diệt cỏ là các protein được yêu cầu bảo hộ.

Các "đoạn" hoặc "đoạn bị cắt cụt" của ADN hoặc trình tự protein như được mô tả theo sáng chế này đề cập đến một phần hoặc một mẫu được biến đổi nhân tạo của các "đoạn" hoặc "đoạn bị cắt cụt" (tức là các trình tự phù hợp cho biểu hiện gen của thực vật) của ADN gốc hoặc các trình tự protein (nucleotit hoặc axit amin) được bao gồm trong sáng chế này. Độ dài trình tự của các trình tự nói trên có thể thay đổi, nhưng phải đủ dài để đảm bảo rằng protein (được mã hóa) là protein kháng thuốc diệt cỏ. Trong một số trường hợp, (cụ thể là biểu hiện trong cây trồng), sẽ có lợi khi sử dụng gen

bị cắt cụt mà nó mã hóa protein bị cắt cụt. Tốt hơn là, gen bị cắt cụt thường mã hóa 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, hoặc 99% của toàn bộ protein.

Do tính dư thừa của các codon di truyền, nhiều trình tự ADN khác nhau có thể mã hoá cùng một trình tự axit amin. Người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật biết cách thức thu được trình tự ADN thay thế mã hoá cùng hoặc về cơ bản là cùng một protein. Các trình tự ADN khác nhau này cũng được bao hàm trong sáng chế này. Trình tự "về cơ bản là cùng" nói trên đề cập đến trình tự mà trong đó các axit amin nhất định được thay thế, loại bỏ, bổ sung hoặc chèn vào, nhưng hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ của chúng vẫn không bị ảnh hưởng đáng kể và cũng bao gồm các đoạn còn duy trì hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ.

Kỹ thuật thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung của một số axit amin trong các trình tự axit amin theo sáng chế này là kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật. Tốt hơn là, việc thay đổi axit amin như thế bao gồm: thay đổi các đặc tính thứ yếu, chẳng hạn như thay thế các axit amin dự bị mà không gây ảnh hưởng đáng kể đến việc gấp xoắn và/ hoặc hoạt tính của protein, loại bỏ một đoạn ngắn, thường là khoảng 1-30 axit amin, kéo dài một đoạn ngắn amin hoặc cacboxyl cuối, chẳng hạn như kéo dài gốc metionin ở amin cuối; peptit liên kết ngắn, chẳng hạn như đoạn có chiều dài khoảng 20 – 25 axit amin.

Các ví dụ về sự thay thế theo cách bảo thủ là thay thế xảy ra trong các nhóm axit amin sau đây: các axit amin cơ bản (như arginin, lysin và histidin), axit amin có tính axit (như axit glutamic và axit aspartic), các axit amin phân

cực (ví dụ glutamin và asparagin), axit amin kỵ nước (như leuxin, isoleucine, và valin), axit amin thơm (ví dụ phenylalanin, tryptophan và tyrosin) và các axit amin phân tử nhỏ (như glyxin, alanin, serin, threonin và methionin). Các thay thế axit amin nói chung không làm thay đổi hoạt tính đặc trưng đã được hiểu rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và đã được mô tả, ví dụ, trong các tài liệu Protein do N. Neurath và R. L. Hill biên soạn, xuất bản bởi Academic Press, New York vào năm 1979. Thay thế thông thường nhất là Ala/ Ser, Val/ Ile, Asp/ Glu, Thu/ Ser, Ala/ Thr, Ser/ Asn, Ala/ Val, Ser/ Gly, Tyr/ Phe, Ala/ Pro, Lys/ Arg, Asp/ Asn, Leu/ Ile, Leu/ Val, Ala/ Glu và Asp/ Gly, và các thay thế ngược của chúng.

Hiển nhiên là, đối với người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật, sự thay thế như vậy có thể xảy ra bên ngoài các khu vực quan trọng đối với chức năng phân tử và vẫn tạo ra sự sản sinh các polypeptit hoạt tính. Đối với polypeptit theo sáng chế này, các gốc axit amin mà cần thiết cho hoạt tính của polypeptit và được chọn là các gốc không thể thay thế có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, chẳng hạn như đột biến gen định vị trí hoặc đột biến gen quét alanin (xem, ví dụ, Cunningham và Wells, năm 1989, Science 244: 1081-1085). Kỹ thuật gần đây được thực hiện bằng cách đưa các đột biến trong mỗi gốc điện tích dương trong phân tử và phát hiện hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ của các phân tử biến đổi thu được, sao cho xác định được các gốc axit amin quan trọng đối với hoạt tính của các phân tử. Các vị trí tương tác của chất nền enzym cũng có thể được xác định bằng cách phân tích cấu trúc ba chiều của chúng, mà cấu trúc ba chiều của chúng có thể được xác định thông qua một số kỹ thuật như phân tích cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), tinh thể học, hoặc gắn nhãn quang ái lực (xem, de Vos và các đồng tác giả, năm 1992, Science 255: 306-312, Smith, và các đồng tác giả, 1992, J. Mol. Biol 224: 899-904, Wlodaver, và các đồng tác giả, 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

Do đó, các trình tự axit amin có sự đồng nhất nhất định với các trình tự axit amin được thể hiện trong SEQ ID No. 2 cũng được bao gồm trong sáng chế này. Độ tương tự/ tương đồng giữa các trình tự này và các trình tự được mô tả trong sáng chế thường là trên 60%, tốt hơn là đạt trên 75%, tốt hơn nữa khi đạt trên 80%, thậm chí tốt hơn nữa khi đạt trên 90% và tốt hơn nữa khi đạt trên 95%. Các polynucleotit và protein được ưu tiên theo sáng chế này cũng có thể được xác định theo các phạm vi đặc trưng hơn về tính tương đồng và/ hoặc tương tự. Ví dụ, chúng có độ tương đồng và/ hoặc tương tự là 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78 %, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với các trình tự được mô tả theo sáng chế này.

Các trình tự điều hòa được mô tả theo sáng chế này bao gồm nhưng không giới hạn ở vùng khởi động, peptit vận chuyển, vùng kết thúc, vùng tăng cường, trình tự dẫn đầu, các intron và các trình tự điều hòa khác có thể được liên kết theo cách thức có khả năng hoạt động với gen 24DT22 nói trên.

Vùng khởi động nói trên là vùng khởi động có thể biểu hiện trong thực vật, trong đó "vùng khởi động có thể biểu hiện trong thực vật" nói trên là đề cập đến vùng khởi động mà đảm bảo rằng các trình tự mã hóa gắn với vùng khởi động có thể biểu hiện trong các tế bào thực vật. Vùng khởi động có thể biểu hiện trong thực vật có thể là vùng khởi động cơ bản. Các ví dụ về các vùng khởi động có khả năng quy định biểu hiện cơ bản trong thực vật bao gồm nhưng không giới hạn ở vùng khởi động 35S được dẫn xuất từ virus khảm Cauliflower, vùng khởi động ubi, vùng khởi động của gen GOS2 dẫn

xuất từ cây lúa và tương tự. Ngoài ra, vùng khởi động có thể biểu hiện trong thực vật có thể là vùng khởi động đặc trưng mô, mà có nghĩa rằng mức độ biểu hiện được quy định bởi vùng khởi động này trong một số mô thực vật, chẳng hạn như trong mô diệp lục (chlorenchyma), cao hơn so với mức độ biểu hiện trong các loại mô khác của cây (có thể đo được thông qua thử nghiệm ARN thông thường), chẳng hạn như vùng khởi động PEP carboxylaza. Ngoài ra, vùng khởi động có thể biểu hiện trong thực vật cũng có thể là vùng khởi động cảm ứng do bị thương tổn. Vùng khởi động cảm ứng do bị thương tổn hoặc vùng khởi động mà nó quy định hình thức biểu hiện cảm ứng do bị thương tổn đề cập đến các vùng cảm ứng mà nhờ đó mức độ biểu hiện của các trình tự mã hóa có thể được tăng lên đáng kể so với các mức độ biểu hiện của các trình tự mã hóa trong các điều kiện tăng trưởng bình thường, khi mà cây trồng bị thương tổn cơ học hoặc thương tổn do côn trùng cắn. Ví dụ về các vùng khởi động cảm ứng do bị thương tổn bao gồm nhưng không giới hạn ở các vùng cảm ứng của gen ức chế proteaza của khoai tây và cà chua (pin I và pin II) và các vùng cảm ứng của gen ức chế proteaza của ngô (MPI).

Các peptit vận chuyển nói trên (còn gọi là trình tự tín hiệu cận tiết hoặc trình tự dẫn đầu) dẫn các sản phẩm biến đổi gen vào các ngăn tế bào hoặc cơ quan tế bào cụ thể. Đối với protein tiếp nhận, peptit vận chuyển nói trên có thể không đồng nhất. Ví dụ, các trình tự mã hóa peptit vận chuyển lục lạp được sử dụng để dẫn tới lục lạp; Hoặc trình tự dự bị 'KDEL' được sử dụng để dẫn tới lưới nội chất hoặc CTPP của gen lectin lúa mạch được sử dụng để dẫn đến không bào.

Trình tự dẫn đầu nói trên bao gồm nhưng không giới hạn ở các trình tự dẫn đầu virus ARN nhỏ, chẳng hạn như trình tự dẫn đầu EMCV (vùng không mã hóa virus encephalomyocarditis 5'); trình tự dẫn đầu của virus khoai tây

Y, chẳng hạn như trình tự dẫn đầu của MDMV (virus khảm gây còi cọc ở ngô); protein liên kết trình tự lớn immunoglobulin ở người (BiP); trình tự dẫn đầu không được phiên mã của vỏ protein mRNA của virus khảm lá cỏ linh lăng (AMV RNA4); trình tự dẫn đầu của virus bệnh đốm cây thuốc lá (TMV).

Vùng tăng cường nói trên bao gồm nhưng không giới hạn các vùng tăng cường virus khảm caoviflower (CaMV), vùng tăng cường virus khảm Figwort (FMV), vùng tăng cường virus Carnations Etched Ring (CERV), vùng tăng cường virus khảm gân lá cây sắn (CsVMV), vùng tăng cường virus khảm Mirabilis (MMV), vùng tăng cường virus vàng xoắn lá Cestrum (CmYLCV), virus xoắn lá cây bông Multan (CLCuMV), vùng tăng cường virus đốm vàng Commelina (CoYMV) và virus khảm sọc úa vàng ở cây lạc (PCLSV).

Đối với việc ứng dụng cho các cây trồng một lá mầm, các intron nói trên bao gồm nhưng giới hạn ở các intron hsp70 của ngô, intron ubiquitin của ngô, intron Adh1, các intron syntasa sucroza hoặc intron Act1 của lúa. Đối với việc ứng dụng cho các cây trồng có hai lá mầm, các intron nói trên bao gồm nhưng không giới hạn ở các intron CAT-1, các intron pKANNIBAL, các intron PIV2 và các intron "siêu ubiquitin".

Các vùng kết thúc nói trên có thể là các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa phù hợp đóng một vai trò trong cây trồng. Các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa phù hợp này bao gồm nhưng không giới hạn ở trình tự tín hiệu polyadenyl hóa có nguồn gốc từ gen nopalín synthetaza (NOS) của *Agrobacterium tumefaciens*, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa dẫn xuất từ gen ức chế proteaza II (pin II), trình tự tín hiệu polyadenyl hóa dẫn xuất từ gen ssRUBISCO E9 của đậu Hà Lan và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa dẫn xuất từ Gen α -tubulin.

Thuật ngữ "được liên kết theo cách thức có khả năng hoạt động" được mô tả trong sáng chế này là đề cập đến việc liên kết các trình tự axit nucleic, việc liên kết này cung cấp cho các trình tự chức năng cần thiết của các trình tự được liên kết. Thuật ngữ "được liên kết theo cách thức có khả năng hoạt động" được mô tả trong sáng chế này có thể là sự liên kết của vùng khởi động với các trình tự liên quan, mà làm cho việc phiên mã các trình tự này được đặt dưới sự kiểm soát và điều chỉnh của vùng khởi động. Khi trình tự liên quan mã hóa một protein và biểu hiện của protein này được yêu cầu, thuật ngữ "được liên kết theo cách thức có khả năng hoạt động" chỉ ra rằng sự liên kết của vùng khởi động và trình tự nói trên làm cho bản phiên mã thu được được dịch mã một cách hiệu quả. Nếu việc liên kết vùng khởi động và trình tự mã hóa dẫn đến sự hợp nhất phiên mã và biểu hiện của protein mã hóa được yêu cầu, thì một liên kết như thế được tạo ra để đảm bảo rằng codon khởi đầu dịch mã đầu tiên của phiên mã thu được là codon khởi đầu của trình tự mã hóa. Ngoài ra, nếu việc liên kết vùng khởi động và trình tự mã hóa dẫn đến hợp nhất phiên mã và biểu hiện của protein mã hóa được yêu cầu, thì một liên kết như thế được tạo ra để đảm bảo rằng codon khởi đầu dịch mã đầu tiên của trình tự không được dịch mã 5' được liên kết với vùng khởi động, và cách liên kết như thế làm cho mối quan hệ giữa các sản phẩm dịch mã thu được và khung đọc mở mã hóa protein liên quan phù hợp với khung đọc. Các trình tự axit nucleic có thể "được liên kết theo cách thức có khả năng hoạt động" bao gồm nhưng không giới hạn ở các trình tự cung cấp chức năng biểu hiện gen (tức là các yếu tố biểu hiện gen, chẳng hạn như vùng khởi động, vùng không dịch mã 5', các intron, vùng mã hóa protein, vùng không dịch mã 3', các vị trí polyadenyl hóa và/ hoặc vùng kết thúc mã hóa); các trình tự cung cấp chức năng vận chuyển ADN và/ hoặc tích hợp (tức là các trình tự biên T-ADN, các vị trí nhận biết của enzym tái tổ hợp đặc trưng theo vị trí, các vị trí nhận biết integraza); các trình tự cung cấp chức năng có thể lựa chọn (tức là, các chỉ thị kháng thuốc kháng sinh, các

gen sinh tổng hợp); các trình tự cung cấp chức năng của các chỉ thị ghi điểm số; các trình tự hỗ trợ hoạt động của các trình tự trong cơ thể sống hoặc trong phòng thử nghiệm (các trình tự vùng đa nối, các trình tự tái tổ hợp đặc trưng theo vị trí) và các trình tự cung cấp chức năng sao chép (tức là nguồn gốc của sự sao chép của vi khuẩn, các trình tự tự sao chép tự động, các trình tự trung tâm).

Sáng chế này có thể mang lại (các) đặc tính kháng thuốc diệt cỏ mới cho cây trồng trong khi không quan sát thấy các tác động bất lợi về kiểu hình, bao gồm sản lượng. Các cây trồng theo sáng chế này có thể chống chịu 2, 3, 4 hoặc 5 lần mức độ sử dụng chung của ít nhất một loại thuốc diệt cỏ phải chịu. Sự cải thiện về mức độ kháng thuốc diệt cỏ này nằm trong phạm vi của sáng chế. Ví dụ, hoàn toàn có khả năng dự đoán được để tối ưu hóa và phát triển thêm nhiều loại công nghệ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để làm tăng biểu hiện của một gen nhất định.

Theo sáng chế này, protein kháng thuốc diệt cỏ nói trên là trình tự axit amin 24DT22 như được thể hiện trong SEQ ID NO 2 của danh sách trình tự. Gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên là trình tự nucleotit 24DT22 như được thể hiện trong SEQ ID NO1 của danh sách trình tự. Để có thể áp dụng cho cây trồng, gen kháng thuốc diệt cỏ nói trên cũng chứa, bên cạnh vùng mã hóa của protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit 24DT22, các yếu tố khác, chẳng hạn như các vùng mã hóa mà nó mã hóa các peptit vận chuyển, các vùng mã hóa mà nó mã hóa các protein chỉ thị chọn lọc hoặc các protein mang lại khả năng kháng côn trùng.

Các protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 như được mô tả trong sáng chế này có khả năng chống chịu hầu hết các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin. Bộ gen của cây trồng theo sáng chế này có chứa các ADN ngoại lai chứa

trình tự nucleotit 24DT22. Các cây này được bảo vệ khỏi sự đe dọa của thuốc diệt cỏ nhờ biểu hiện của lượng hữu hiệu của protein này. "Lượng hữu hiệu" là liều lượng không gây tác hại hoặc tác hại nhẹ. Đồng thời, cây trồng phải bình thường về mặt hình thái và có thể được trồng theo các cách thức thông thường để tiêu dùng và/ hoặc sản xuất các sản phẩm.

Mức độ biểu hiện của các protein tinh thể kháng thuốc diệt cỏ (ICP) trong các vật liệu thực vật có thể được xác định bằng cách sử dụng nhiều phương pháp được mô tả trong lĩnh vực này, chẳng hạn như phương pháp định lượng mRNA mã hoá protein kháng thuốc diệt cỏ trong mô thông qua việc sử dụng các đoạn mồi đặc thù hoặc phương pháp định lượng protein kháng thuốc diệt cỏ một cách trực tiếp và đặc thù.

Sáng chế này đề xuất protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hoá và sử dụng chúng với các ưu điểm sau:

1. Hoạt tính kháng thuốc diệt cỏ mạnh. Protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 theo sáng chế này có khả năng kháng mạnh thuốc diệt cỏ, đặc biệt là các loại thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, cụ thể là 2,4-D.

2. Phổ kháng thuốc diệt cỏ rộng. Protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 theo sáng chế này thể hiện khả năng kháng cao đối với nhiều loại thuốc diệt cỏ phenoxy auxin dùng cho cây trồng, chính vì thế chúng có triển vọng ứng dụng rộng rãi trên cây trồng.

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế này sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các hình vẽ minh họa và các ví dụ đính kèm như sau:

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ xây dựng vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T có chứa trình tự nucleotit 24DT22 được sử dụng trong protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này;

Hình 2 thể hiện sơ đồ xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 có chứa trình tự nucleotit 24DT22 được sử dụng trong protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này;

Hình 3 thể hiện sơ đồ xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301N có chứa trình tự kiểm chứng được sử dụng trong protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này;

Hình 4 thể hiện hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ của cây họ Cải (*Arabidopsis*) biến đổi gen T1 có protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này;

Hình 5 thể hiện hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ của cây đậu nành biến đổi gen T1 có protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này;

Hình 6 thể hiện sơ đồ để xây dựng các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 có chứa trình tự nucleotit 24DT22 được sử dụng trong protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này;

Hình 7 thể hiện sơ đồ để xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764N có chứa trình tự kiểm chứng được sử dụng trong protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế này.

Mô tả chi tiết phương án ưu tiên:

Giải pháp kỹ thuật về protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa và việc sử dụng chúng theo sáng chế sẽ được minh họa rõ hơn thông qua những ví dụ sau đây:

Ví dụ 1: Thu và tổng hợp trình tự gen 24DT22

1. Thu trình tự gen 24DT22

Trình tự axit amin của protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 (292 axit amin) được thể hiện là SEQ ID NO: 2 trong danh sách trình tự. Trình tự nucleotit (879 nucleotit) mã hoá trình tự axit amin tương ứng của protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 (292 axit amin) được thể hiện là SEQ ID NO: 1 trong danh sách trình tự.

2. Tổng hợp trình tự nucleotit như được mô tả bên trên

Trình tự nucleotit 24DT22 (được thể hiện là SEQ ID NO: 1 trong danh sách các trình tự) đã được tổng hợp bởi GenScript Co., Ltd., Nam Kinh, Trung Quốc; Trình tự nucleotit 24DT22 tổng hợp (SEQ ID NO: 1) được liên kết với một vị trí hạn chế SpeI ở đầu 5', và một điểm hạn chế KsaI ở đầu 3'.

Ví dụ 2: Xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp của cây họ Cải (*Arabidopsis thaliana*) và đậu nành

1. Xây dựng vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T có chứa trình tự nucleotit 24DT22

Trình tự nucleotit 24DT22 được tổng hợp đã được nhân bản vào vector tạo dòng pGEM-T (Promega, Madison, USA, CAT: A3600), để nhận được vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T theo chỉ dẫn của vector Promega pGEM-T, và quá trình xây dựng được thể hiện trong Hình 1 (trong đó Amp là gen kháng ampicillin, f1 là nguồn gốc nhân bản của thể thực khuẩn f1, LacZ là codon khởi đầu của LacZ, SP6 là vùng khởi động của polymeraza ARN SP6, T7 là vùng khởi động của polymeraza ARN T7, 24DT22 là trình tự nucleotit 24DT22 (SEQ ID NO: 1), MCS là các vùng tạo dòng).

Các vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T sau đó biến nạp vào tế bào E.coli T1 khả biến (Transgen, Bắc Kinh, Trung Quốc, CAT: CD501) thông qua phương pháp sốc nhiệt. Các điều kiện gây sốc nhiệt như sau: 50 µl tế bào E.coli T1 khả biến và 10 µl ADN plasmit (vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T) được ủ trong bể nước ở 42°C trong 30 giây. Sau đó, các tế bào E. coli được nuôi cấy rung lắc ở 37 °C trong 1 giờ (100 vòng/ phút trong máy áp rung lắc) và sau đó được nuôi lớn trên một đĩa LB (10g/L Trypton, 5g/L chiết xuất nấm men, 10g/L NaCl, 15g/L Agar và độ pH đã được điều chỉnh lên 7,5 bằng NaOH) được phủ mặt bằng IPTG (Isopropyl thio-beta-D-galactosa glucosit), X-gal (5-bromin-4-clorin-3-indol-beta-D-galactosa glucosit) và ampicillin (100mg/L) rồi để qua đêm. Các khuẩn lạc màu trắng được lấy ra và nuôi cấy trong môi trường nước thịt LB (10g/L Trypton, 5g/L chiết xuất nấm men, 10g/L NaCl, 100 mg/L ampicillin và độ pH được điều chỉnh đến 7,5 với NaOH) ở 37°C để qua đêm. Các plasmit của chúng được chiết tách bằng phương pháp ly giải bằng kiềm như sau: dung dịch vi khuẩn được ly tâm trong vòng 1 phút ở tốc độ 12000 vòng/phút, loại bỏ phần nổi trên bề mặt và phần viên được tái huyền phù trong 100µL trong dung dịch nước đá lạnh I (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (etylendiāminetetraaxetic axit) và 50 mM glucoza, pH = 8,0); Sau đó bổ sung 200 µl dung dịch vừa mới được chuẩn bị II (0,2 M NaOH, SDS 1% (natri đodexyl sunfat)) và ống

được đảo ngược 4 lần, trộn và sau đó cho vào trong nước đá trong vòng 3-5 phút; bổ sung 150µl dung dịch lạnh III (3 M kali axetat và 5 M axit axetic), trộn đều ngay lập tức và ủ trên đá trong khoảng 5-10 phút; hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, hai lượng etanol khan được thêm vào phần nổi trên bề mặt, trộn và sau đó đặt ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 phút; hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, phần nổi trên bề mặt được loại bỏ, và phần viên được sấy khô sau khi rửa bằng etanol 70% (thể tích/thể tích); bổ sung 30 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0) chứa RNase (20µg/mL) để hòa tan chất kết tủa; hỗn hợp được ủ ở 37°C trong một bồn nước trong 30 phút để thủy giải ARN và lưu trữ ở - 20°C để sử dụng về sau.

Sau khi các plasmit đã chiết tách được xác thực bằng các enzym giới hạn *SpeI* và *KasI*, các dòng dương tính đã được xác thực thông qua việc xếp trình tự. Kết quả cho thấy trình tự nucleotit 24DT22 mà được chèn vào vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T nói trên là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong danh sách trình tự, chỉ ra rằng trình tự nucleotit 24DT22 đã được chèn một cách chính xác.

2. Xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 của cây họ Cải (*Arabidopsis thaliana*) và đậu nành có chứa trình tự nucleotit 24DT22

Các vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-01 (vector backbone: pCAMBIA2301, có sẵn từ Viện CAMBIA) được thủy giải bằng các enzym giới hạn *SpeI* và *KasI*. Đoạn trình tự nucleotit bị cắt cụt 24DT22 được thắt giữa các điểm giới hạn *SpeI* và *KasI* của vector biểu hiện DBNBC-01 để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301. Đây là một phương pháp thông thường để người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật có thể xây dựng vector biểu hiện thông qua việc thủy giải enzym giới hạn. Sơ đồ

xây dựng được thể hiện trong Hình 2 (Kan: gen kanamycin, RB: đường biên phải, AtUbi10: vùng gen khởi động Arabidopsis Ubiquitin (Ubiquitin) 10 (SEQ ID NO: 3); 24DT22: trình tự nucleotit 24DT22 (SEQ ID NO: 1); Nos: vùng kết thúc của gen synthetaza nopaline (SEQ ID NO: 4); prCaMV35S: vùng khởi động virus khảm Cauliflower 35S (SEQ ID NO: 5); PAT: gen glutosinat acetyl transferaza (SEQ ID NO: 6); TCaMV35S: vùng kết thúc virus khảm Cauliflower 35S (SEQ ID NO: 7); LB: đường biên trái).

Vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 được biến nạp vào tế bào E.coli T1 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt như sau: 50 µl tế bào E.coli T1 khả biến và 10 µl ADN plasmit (vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100301) được ủ trong bể nước ở 42°C trong 30 giây. Sau đó, các tế bào E. coli được nuôi cấy rung lắc ở 37°C trong 1 giờ (100 vòng/ phút trong máy lắc) và sau đó được nuôi lớn trên một đĩa LB cứng (10g/L Trypton, 5g/L chiết xuất nấm men, 10g/L NaCl, 15g/L Agar và độ pH đã được điều chỉnh lên 7,5 bằng NaOH) chứa 50mg/L kanamycin ở 37°C trong 12 giờ. Các khuẩn lạc màu trắng được lấy ra và nuôi trong môi trường nước thịt LB (10g/L Trypton, 5g/L chiết xuất nấm men, 10g/L NaCl, 50 mg/L kanamycin và độ pH được điều chỉnh đến 7,5 với NaOH) ở 37°C để qua đêm. Các plasmit của chúng được chiết tách bằng phương pháp ly giải bằng kiềm.

Sau khi các plasmit chiết ra được xác nhận bằng các enzym giới hạn SpeI và KsaI, các dòng dương tính đã được xác thực thông qua việc xếp trình tự. Kết quả cho thấy trình tự nucleotit giữa các điểm giới hạn SpeI và KsaI trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 là trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong danh sách trình tự, tức là trình tự nucleotit 24DT22.

3. Xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301N của cây họ Cải (*Arabidopsis thaliana*) và đầu nòng có chứa trình tự kiểm chứng

Tiếp theo quy trình xây dựng vector tạo dòng tái tổ hợp DBN100301N bao gồm trình tự nucleotit 24DT22 như được mô tả trong phần 1 của Ví dụ 2, vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01R-T chứa trình tự kiểm chứng được xây dựng bằng cách sử dụng trình tự kiểm chứng (SEQ ID NO: 8). Các dòng dương tính đã được xác nhận việc sắp xếp trình tự. Kết quả cho thấy trình tự nucleotit được chèn thêm vào vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01R-T là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 trong danh sách trình tự, chỉ ra rằng trình tự nucleotit kiểm chứng đã được chèn một cách chính xác.

Tiếp theo quy trình xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 chứa trình tự nucleotit 24DT22 như được mô tả trong phần 2 của Ví dụ 2, vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301N chứa trình tự kiểm chứng được xây dựng bằng cách sử dụng trình tự kiểm chứng và cấu trúc của vector được thể hiện tại Hình 3 ((vector backbone: pCAMBIA2301, có sẵn tại Viện CAMBIA); Kan: gen kanamycin, RB: đường biên phải, AtUbi10: vùng gen khởi động *Arabidopsis* Ubiquitin (Ubiquitin) 10 (SEQ ID NO: 3); mN: trình tự kiểm chứng (SEQ ID NO: 8); Nos, vùng kết thúc của gen synthetaza nopaline (SEQ ID NO: 4); prCaMV35S: vùng khởi động virus khảm Cauliflower 35S (SEQ ID NO: 5); PAT: gen glutosinat acetyl transferaza (SEQ ID NO: 6); TCaMV35S: vùng kết thúc virus khảm hoa súp lơ 35S (SEQ ID NO: 7); LB: đường biên trái). Các dòng dương tính đã được xác nhận thông qua việc xếp trình tự. Kết quả cho thấy trình tự kiểm chứng được chèn thêm vào vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301N là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO: 8 trong danh sách trình tự, chỉ ra rằng trình tự nucleotit kiểm chứng đã được chèn một cách chính xác.

Ví dụ 3: Thu cây họ Cải (*Arabidopsis*) có trình tự nucleotit 24DT22 được chèn vào

1. Biến nạp vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bằng các vector biểu hiện tái tổ hợp

Các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 và DBN100301N được xây dựng một cách chính xác (trình tự kiểm chứng) đã được biến nạp vào *Agrobacterium* GV3101 sau phương pháp làm lạnh nhanh bằng nitơ lỏng như sau: 100 μ l *Agrobacterium* GV3101 và 3 μ l ADN plasmid (vector biểu hiện tái tổ hợp) được đưa vào trong nitơ lỏng trong 10 phút và sau đó được ủ trong bể nước ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, các tế bào *Agrobacterium* GV3101 đã biến nạp được cấy trong nước thịt LB và nuôi cấy ở 28°C, 200 vòng/phút trong 2 giờ và được trải trên một đĩa LB có chứa 50 mg/L rifampixin (Rifampixin) và 50 mg/L kanamycin cho đến khi các khuẩn lạc đơn dương tính xuất hiện. Các khuẩn lạc đơn dương tính được lấy ra và nuôi cấy và chiết tách các plasmid của chúng. Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 đã được xác thực bằng các enzym giới hạn SmaI và PstI và vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301N (trình tự kiểm chứng) được xác thực bằng các enzym giới hạn SmaI và BglI. Kết quả cho thấy các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 và DBN100301N (trình tự kiểm chứng) đều có cấu trúc đúng, tương ứng.

2. Thu cây trồng biến đổi gen họ Cải (*Arabidopsis thaliana*)

Các hạt giống cây họ Cải (*Arabidopsis*) hoang dại được ngâm lơ lửng trong dung dịch agarosa 0,1% (khối lượng/ thể tích) và được giữ ở 4°C trong 2 ngày để đáp ứng nhu cầu ngủ đông nhằm đảm bảo sự nảy mầm đồng loạt của hạt giống. Khoáng chất bón cây và phân ngựa được trộn lẫn với nhau

và tưới ẩm bằng nước ngầm. Hỗn hợp đất đã được để ráo nước trong 24 giờ. Các hạt giống được xử lý trước được gieo trồng trong hỗn hợp đất và được phủ bằng một lớp mặt nạ giữ ẩm trong 7 ngày. Hạt giống đã nảy mầm và các cây được trồng trong nhà kính với nhiệt độ cố định là 22°C với độ ẩm không đổi là 40-50% và điều kiện ngày dài với cường độ ánh sáng 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (16 giờ chiếu sáng / 8 giờ tối). Các cây trồng ngay từ đầu được tưới bằng dung dịch dinh dưỡng Hoagland và sau đó tưới bằng nước đã được khử ion để giữ đất ẩm nhưng không bị ướt.

Phương pháp nhúng thực vật đã được sử dụng để biến đổi *Arabidopsis*. Một hoặc nhiều môi trường YEP khoảng 15-30 ml chứa 50 mg/L kanamycin và 10 mg/L rifampixin đã được cấy các khuẩn *Agrobacterium* được lựa chọn làm môi trường tiền nuôi cấy. Môi trường tiền nuôi cấy được ủ ở 28°C và lắc với tốc độ 220 vòng/phút qua đêm. Mỗi môi trường tiền nuôi cấy được sử dụng để nuôi cấy hai môi trường nuôi cấy là 500 ml môi trường YEP chứa kanamycin (100 mg/L) và rifampixin (10 mg / L) và những môi trường cấy này được ủ ở 28°C trong máy ủ lắc qua đêm. Các môi trường được ly tâm ở tốc độ 8700 $\times$ g trong 10 phút ở nhiệt độ phòng để làm cho các tế bào kết tủa và loại bỏ phần nổi trên bề mặt thu được. Các viên tế bào được tái huyền phù một cách nhẹ nhàng trong 500 ml môi trường có thể thấm qua được, chứa 1/2 x MS muối/ vitamin B5, sucroza 10% (khối lượng/ thể tích), 0.044 μM Benzylaminopurin (10 $\mu\text{L}/\text{L}$ (1 mg/mL dung dịch gốc trong DMSO)) và 300 μl / L Silvet L-77. Cây khoảng 1 tháng tuổi được ngâm trong môi trường đó trong 15 giây và các cụm hoa mới nhất được bảo đảm nhúng ngập trong môi trường. Sau đó các cây trồng được đặt qua một bên và được phủ (bằng vật liệu trong suốt hoặc không trong suốt) trong 24 giờ, sau đó rửa sạch bằng nước và đặt thẳng đứng. Cây được trồng ở nhiệt độ 22°C theo chu kỳ ánh sáng có 16 giờ sáng/ 8 giờ tối. Hạt giống được thu hoạch sau khi nhúng trong 4 tuần.

Các hạt giống T1 vừa mới được thu hoạch (trình tự nucleotit 24DT22 và trình tự kiểm chứng) được sấy khô ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày. Hạt được trồng trong các đĩa nảy mầm (26,5 x 51 cm), 200 mg hạt giống T1 (khoảng 10000 hạt)/ đĩa. Hạt giống được ngâm lơ lửng trong 40 mL dung dịch agarosa 0,1% (khối lượng/ thể tích) và được bảo quản ở 4°C trong 2 ngày để đáp ứng nhu cầu ngủ đông để đảm bảo sự nảy mầm đồng loạt.

Khoáng chất bón cây và phân ngựa đã được trộn lẫn với nhau và tưới bằng nước ngầm và được để ráo nước bằng trọng lực. Các hạt giống đã xử lý trước (mỗi 40 mL) được trồng đều trên hỗn hợp đất bằng cách sử dụng pipet và phủ mặt nạ giữ ẩm trong 4 đến 5 ngày. Mặt nạ được bỏ ra 1 ngày trước khi chọn lọc thể biến nạp đầu tiên bằng cách phun glufosinat-amoni (chọn lọc gen PAT đồng biến nạp) sau khi nảy mầm.

Vào ngày thứ 7 sau khi trồng (DAP) và ngày thứ 11 DAP, tương ứng, các cây T1 (giai đoạn mọc lá mầm và giai đoạn mọc được 2-4 lá, tương ứng) được phun dung dịch thuốc diệt cỏ Liberty 0,2% (200g ai/L glufosinat-amoni) sử dụng vòi phun khí nén DeVilbiss với thể tích phun 10 ml/đĩa (703 L/ha) để cung cấp một lượng glufosinat-amoni hiệu quả (280g ai/ha) cho mỗi lần phun. Các cây sống sót (cây trồng phát triển tích cực) được xác nhận trong khoảng thời gian từ 4 đến 7 ngày sau lần phun cuối và chuyển vào một chậu vuông (7cmx7cm) được làm từ chất khoáng bón cây và phân ngựa (3-5 cây/chậu). Các cây cấy ghép được phủ mặt nạ giữ ẩm trong 3-4 ngày và đặt trong phòng nuôi cấy ở 22°C hoặc đặt trực tiếp vào nhà kính như mô tả bên trên. Sau đó, mặt nạ được loại bỏ và cây trồng được trồng trong nhà kính (22 ± 5°C, 50 ± 30% RH, 14 giờ chiếu sáng: 10 giờ tối, tối thiểu 500µE / m²s¹ ánh sáng tự nhiên + ánh sáng bổ sung) ít nhất một ngày trước khi kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ phenoxy auxin của 24DT22.

Ví dụ 4: Thử nghiệm hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ của cây họ Cải (*Arabidopsis*) biến đổi gen

Gen 24DT22 được sử dụng để biến đổi *Arabidopsis* cho lần đầu. Đầu tiên, các thể biến nạp T1 được lựa chọn từ lớp hạt giống không bị biến đổi, sử dụng sơ đồ chọn lọc glufosinat-amoni. Khoảng 20000 hạt giống T1 được sàng lọc, trong đó nhận biết được 314 dòng của thể biến nạp dương tính thể hệ T1 (gen PAT), tức là hiệu quả biến đổi là khoảng 1,6%. Thử nghiệm hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ đối với muối đimetyl amoni 2,4-D và agroxon của cây *Arabidopsis* T1 biến đổi bằng trình tự nucleotit 24DT22, trình tự nucleotit kiểm chứng, tương ứng và cây họ Cải (*Arabidopsis*) hoang dại đã được thực hiện sau 18 ngày trồng.

Các cây *Arabidopsis* T1 đã biến đổi bằng trình tự nucleotit 24DT22, trình tự nucleotit kiểm chứng, tương ứng và cây *Arabidopsis* hoang dại được phun muối đimetyl amoni 2,4-D (560g ae/ha, nồng độ gấp 1 lần trên đồng ruộng), agroxon (560g ae/ha, nồng độ gấp 1 lần trong đồng ruộng) và dung môi trống (nước). Tình trạng kháng của cây trồng được đánh giá vào ngày thứ 7 và 14 sau khi phun. Cây trồng có tình trạng phát triển phù hợp với dung môi trống (nước) từ 7 ngày sau khi phun được phân loại là cây có độ kháng cao; Cây có lá xoắn như cánh hoa hồng 7 ngày sau khi phun được phân loại là cây có độ kháng vừa; Các cây không có khả năng đứng vững từ 14 ngày sau khi phun được phân loại là cây có độ kháng thấp và cây chết từ 14 ngày sau khi phun được phân loại là cây không có độ kháng. Bởi vì mỗi cá thể cây *Arabidopsis* T1 là một sự kiện biến đổi độc lập, nên khác biệt đáng kể của các đáp ứng của các cá thể T1 là có thể là kết quả mong đợi ở liều lượng nhất định. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1 và Hình 4.

Bảng 1. Kết quả kháng thuốc diệt cỏ của cây Arabidopsis T1 biến đổi gen

Phương pháp xử lý	Bộ gen Arabidopsis	Độ kháng cao	Độ kháng vừa	Độ kháng thấp	Không có độ kháng	Tổng cộng
Dung môi trồng (H ₂ O)	24DT22	31	0	0	0	31
	Kiểm soát	32	0	0	0	32
	Hoang dã	32	0	0	0	32
560g ae/ha	24DT22	28	1	2	0	31
Muối 2,4-D đimetyl amoni (1x 2,4-D)	Kiểm soát	0	0	0	32	32
	Hoang dã	0	0	0	32	32
560g ae/ha	24DT22	25	3	1	3	32
agroxon (1xMCPA)	Kiểm soát	0	0	0	32	32
	Hoang dã	0	0	0	32	32

Đối với cây Arabidopsis, 560 g ae/ha của 2,4-D và agroxon là liều hữu hiệu để phân biệt các cây nhạy cảm với các cây có độ kháng trung bình. Các kết quả thể hiện trong Bảng 1 và Hình 4 cho thấy rằng gen 24DT22 mang lại khả năng kháng thuốc diệt cỏ cho cá thể cây Arabidopsis (chỉ có một số phần của cây có tính kháng bởi vì các vị trí chèn của các cây thế hệ T1 là ngẫu nhiên. Chính vì vậy, các mức độ biểu hiện gen kháng cũng khác nhau, tạo ra các mức

độ kháng khác nhau), đặc biệt là đối với thuốc diệt cỏ phenoxy auxin. Cây *Arabidopsis* hoang dại và cây *Arabidopsis* được biến đổi bằng trình tự kiểm chứng không có tính kháng thuốc diệt cỏ phenoxy auxin.

Ví dụ 5: Thu cây đậu nành được chèn trình tự nucleotit 24DT22

1. Biến nạp *Agrobacterium tumefaciens* bằng các vector biểu hiện tái tổ hợp

Các vector biểu hiện tái tổ hợp được xây dựng một cách chính xác DBN100301 và DBN100301N (trình tự kiểm chứng) được biến nạp vào *Agrobacterium* LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT: 18313-015) bằng phương pháp làm lạnh nhanh bằng nitơ lỏng, với các điều kiện biến nạp là: *Agrobacterium* LBA4404 và 3 μ L ADN plasmit (vector biểu hiện tái tổ hợp) được đưa vào ni tơ lỏng trong 10 phút và sau đó ủ trong bể nước ở 37°C trong 10 phút. Sau đó các tế bào *Agrobacterium* LBA4404 đã biến nạp được cấy trong nước thịt LB và được nuôi cấy ở 28 °C với tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ và trải trên một đĩa LB chứa 50 mg/L rifampixin (Rifampixin) và 50 mg/L kanamycin cho đến khi các khuẩn lạc đơn dương tính xuất hiện. Các khuẩn lạc đơn dương tính được lấy ra và nuôi cấy và chiết tách các plasmit của chúng. Các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 được xác thực bằng các enzym giới hạn SmaI và PstI và vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301N (trình tự kiểm chứng) được xác thực bằng các enzym giới hạn SmaI và BglI. Kết quả cho thấy các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 và DBN100301N (trình tự kiểm chứng) đều có cấu trúc đúng, tương ứng.

2. Thu cây đậu nành chuyển gen

Đốt lá mầm của cây đậu nành hoang dại (*Zhonghuang 13*) được nuôi cấy vô trùng với *Agrobacterium tumefaciens* được mô tả trong Ví dụ 1 để chuyển T-AND của các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100301 và DBN100301N được mô tả trong Ví dụ 2 và 3 (chứa trình tự khởi động của gen *Arabidopsis thaliana* ubiquitin 10, trình tự nucleotit 24DT22, trình tự kiểm chứng, vùng kết thúc Nos, vùng khởi động virus khảm Cauliflower 35S, gen glufosinat axetyl transferaza và vùng kết thúc virus khảm Cauliflower 35S) vào bộ gen đậu nành, thu được cây đậu nành có chứa 24DT22 và các trình tự nucleotit kiểm chứng và đồng thời cây đậu nành hoang dại được lấy làm cây kiểm chứng.

Đối với quá trình biến đổi cây đậu nành qua trung gian *agrobacterium*, mô tả ngắn gọn, hạt giống đậu nành chín được làm nảy mầm trong một môi trường nảy mầm đậu nành (3.1g/L muối B5, vitamin B5, 20g/L sucroza, 8g/L agar và pH 5,6) và được cấy ở các điều kiện sau: nhiệt độ, $25 \pm 1^\circ\text{C}$; Quang chu kỳ (ánh sáng/ bóng tối), 16/8 giờ. Cây đậu nành vô trùng tươi với đốt lá mầm phồng lên được thu về sau 4-6 ngày nảy mầm, cắt bỏ trụ dưới lá mầm nằm dưới chân đốt lá mầm 3-4mm, cắt lá mầm theo chiều dọc, và loại bỏ chồi ngọn, chồi bên và rễ chính khỏi lá mầm, tạo một thương tổn ở đốt lá mầm bằng phần cạnh phía sau của dao cắt và đưa thể rắn *agrobacterium* vào tiếp xúc với các mô đốt lá mầm bị tổn thương, trong đó *agrobacterium* có thể chuyển trình tự nucleotit 24DT22 tới các mô đốt lá mầm bị tổn thương (Bước 1, bước nhiễm khuẩn: ở bước này, tốt nhất là, mô đốt lá mầm được ngâm trong thể rắn *Agrobacterium* ($\text{OD}_{660} = 0,5-0,8$, môi trường nhiễm khuẩn (muối MS 2,15 g/L, vitamin B5, 20g/L sucroza, 10g/L glucoza, 40mg/L acetosyringon (AS), 4g/L 2-(N-Morpholino) etanesulfonic axit (MES), 2mg/L zeatin (ZT), pH 5,3)) để bắt đầu quá trình cấy. Nuôi cấy đồng thời mô đốt lá mầm với *agrobacterium* trong một khoảng thời gian (3 ngày) (Bước 2: Bước nuôi cấy đồng thời). Tốt hơn là, các mô đốt lá mầm được cấy trong môi trường rắn (4.3 g/L muối MS, vitamin B5, 20g/L sucroza, 10g/L glucoza, 4g/L 2-(N-Morpholino) etanesulfonic axit (MES), 2mg/L zeatin, 8g/L agar

và pH 5,6) sau khi nhiễm khuẩn. Sau bước nuôi cấy đồng thời này, bước "hồi phục" chọn lọc có thể được tiến hành. Trong bước "hồi phục", môi trường hồi phục (muối 3.1g/L B5, vitamin B5, 1g/L 2- (N-Morpholino) etanesulfonic axit, 30g/L sucroza, 2mg/L zeain (ZT), 8g/L agar, 150mg/L xephalosporin, 100mg/L glutamic axit, 100mg/L aspartic axit và pH 5,6) có chứa ít nhất một loại thuốc kháng sinh ức chế *Agrobacterium* đã biết (xephalosporin) mà không có tác nhân chọn lọc đối với chất truyền nhiễm thực vật (Bước 3: Bước phục hồi). Tốt hơn là các mô được nuôi cấy trên môi trường rắn có chứa các kháng sinh nhưng không có tác nhân chọn lọc để loại bỏ *Agrobacterium* và cung cấp một khoảng thời gian phục hồi cho các tế bào bị nhiễm khuẩn. Sau đó, các mô đã cấy được trồng trên một môi trường có chứa tác nhân chọn lọc (glufosinat) và thể sần đang lớn, đã biến đổi, được chọn (Bước 4: bước chọn lọc). Tốt hơn là các mô được trồng trên môi trường rắn có chọn lọc có chứa các tác nhân chọn lọc (muối B5 3.1g/L, vitamin B5, 1g/L 2- (N-Morpholino) etanesulfonic axit (MES), 30g/L sucroza, 1mg/L 6-benzyladenin (6-BAP), 8g/L agar, 150mg/L xephalosporin, 100mg/L axit glutamic, 100mg/L axit aspartic, 6mg/L glufosinat và pH 5,6), kết quả thu được là sự tăng trưởng chọn lọc của các tế bào biến đổi. Sau đó, thể sần được tái sinh thành cây (Bước 5: Bước tái sinh), tốt nhất là, thể sần được trồng trên môi trường rắn có chứa tác nhân chọn lọc (môi trường phân hoá B5 và môi trường bén rễ B5) để tái sinh thành cây.

Thể sần có khả năng kháng thu được được chuyển sang môi trường phân hoá B5 (3.1g/L muối B5, vitamin B5, 1g/L 2- (N-morpholino) etanesulfonic axit (MES), 30g/L sucroza, 1mg/L zeatin (ZT) , 8g/L agar, 150mg/L xephalosporin, 50mg/L axit glutamic, 50mg/L axit aspartic, 1mg/L gibberellin, 1mg/L auxin, 6mg/L glufosinat và pH 5,6) để trồng và phân hoá ở 25°C . Cây giống đã phân hoá được chuyển sang môi trường bén rễ B5 (muối B5 3,1g/L, vitamin B5, 1g/L 2-(N-Morpholino) etanesulfonic axit (MES), 30g/L sucroza, 8g/L agar, 150mg/L xephalosporin và 1mg/L axit indole-butyric (IBA)) và được trồng lớn đến độ cao

khoảng 10cm ở 25°C. Tiếp theo, cây con được chuyển đến và trồng trong nhà kính cho đến khi ra quả. Trong nhà kính, cây đậu nành được trồng ở 26°C trong 16 giờ và ở 20°C trong 8 giờ mỗi ngày.

3. Xác thực cây đậu nành biến đổi gen bằng kỹ thuật TaqMan

100 mg lá của mỗi cây đậu nành đã biến đổi (cây đậu nành biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 hoặc trình tự nucleotit kiểm chứng) được lấy làm mẫu tương ứng. Bộ gen ADN của chúng được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) và số lượng bản sao gen 24DT22 được định lượng bằng phép phân tích định lượng huỳnh quang dựa trên đoạn dò Taqman PCR. Cây đậu nành hoang dại được lấy làm cây kiểm chứng và được phân tích dựa theo các quy trình như mô tả ở trên. Các thử nghiệm được thực hiện ba lần và lấy giá trị trung bình làm kết quả.

Phương pháp cụ thể để phát hiện số lượng sao chép của gen PAT được mô tả như sau:

Bước 11: 100 mg lá của mỗi cây đậu nành biến đổi (cây đậu nành biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 hoặc trình tự nucleotit kiểm chứng, tương ứng) và cây đậu nành hoang dại được lấy và nghiền thành thể đồng nhất trong một cối giã trong nitơ lỏng. Mỗi mẫu được thực hiện ba lần.

Bước 12. Bộ gen của các ADN của các mẫu trên đã được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) theo hướng dẫn trên sản phẩm;

Bước 13. Nồng độ của AND bộ gen của các mẫu trên được xác định bằng cách sử dụng NanoDrop 2000 (Thermo Scientific);

Bước 14. Nồng độ ADN của bộ gen được điều chỉnh về cùng phạm vi 80-100 ng / μ l;

Bước 15: Số lượng bản sao của các mẫu được định lượng bằng bằng phép phân tích định lượng huỳnh quang dựa trên đoạn dò Taqman PCR, mẫu định lượng với số lượng sao chép đã biết được lấy làm mẫu chuẩn và cây đậu nành hoang dại được lấy làm cây kiểm chứng. Quy trình này được thực hiện trong ba lần đối với mỗi mẫu và lấy giá trị trung bình làm kết quả. Các đoạn mồi và đoạn dò được sử dụng trong phép phân tích định lượng huỳnh quang PCR đã được thể hiện như sau:

Các đoạn mồi và đoạn dò đã được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit PAT:

Đoạn mồi 1: GAGGGTGTTGTGGCTGGTATTG như được thể hiện trong SEQ ID NO: 11 trong danh sách trình tự;

Đoạn mồi 2: TCTCAACTGTCCAATCGTAAGCG như được thể hiện trong SEQ ID NO: 12 trong danh sách trình tự;

Đoạn dò 1: CTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAG như được thể hiện trong SEQ ID NO: 13 trong danh sách trình tự;

Hệ thống phản ứng PCR:

JumpStart [™] Taq ReadyMix [™] (Sigma) 10 μ L

50 $\times$ Hỗn hợp đoạn mồi/ đoạn dò 1 μ L

bộ gen ADN 3 μ L

Nước (ddH₂O) 6 μ L

Hỗn hợp 50 × đoạn mồi/ đoạn dò chứa 45 µL của mỗi đoạn mồi (1 mM), 50 µL đoạn dò (100 µM) và 860 µL của 1 x dung dịch đệm TE và được lưu trữ trong ống màu hồng phách ở 4°C.

Điều kiện phản ứng PCR:

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

Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm SDS 2.3 (Applied Biosystems).

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng tất cả các trình tự nucleotit của trình tự nucleotit 24DT22 đã được tích hợp vào các cây đậu nành được dò tìm nói trên. Hơn nữa, tất cả các cây đậu nành biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 hoặc trình tự kiểm chứng đều có chứa một bản sao của gen, tương ứng.

Ví dụ 6: Hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ của cây đậu nành biến đổi gen

Các thử nghiệm về hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ đối với muối dimethyl amoni 2,4-D và agroxon của cây đậu nành có chứa trình tự nucleotit 24DT22 và trình tự nucleotit kiểm chứng tương ứng và các cây đậu nành hoang dại (giai đoạn V3 - V4) được thực hiện tương ứng.

Các cây đậu nành có chứa trình tự nucleotit 24DT22, trình tự nucleotit kiểm chứng và các cây đậu nành hoang dại được lấy và được phun bằng muối dimethyl amoni 2,4-D (2240g ae/ha, nồng độ gấp 4 lần trên đồng ruộng), agroxon

(2240g ae/ha, nồng độ gấp 4 lần trên đồng ruộng) và dung môi trống (nước). Thực hiện thống kê về mức độ bị tác hại của mỗi cây trồng do thuốc diệt cỏ gây ra dựa trên mức độ bị xoắn của lá và mức độ bị tác hại ở điểm phát triển 6 giờ (6HAT), hai ngày (2DAT), 7 ngày (7DAT) và 14 ngày (14DAT) sau khi phun ở những giai đoạn tương ứng: nếu lá phẳng như lá cây hoang dại và điểm phát triển còn nguyên vẹn, mức độ tác hại là 0%; Nếu lá xoắn và héo và điểm phát triển đã chết, mức độ thiệt hại là 100%. Tổng cộng có ba giống có chứa trình tự nucleotit 24DT22 đã biến đổi (S1, S2 và S3), hai giống có trình tự kiểm chứng chuyển gen (S4 và S5) và một giống hoang dại (CK1); Chọn 10 ~ 15 cây từ mỗi giống để thực hiện kiểm tra. Kết quả được thể hiện trong Bảng 2 và Hình 5.

Bảng 2 Kết Quả Thử Nghiệm về Tính Kháng Thuốc Diệt Cỏ của Cây Đậu Nành Biến Đổi Gen T1

Phương pháp xử lý	Bộ gen đậu nành	Tác hại trung bình % 6HAT	Tác hại trung bình % 2DAT	Tác hại trung bình % 7DAT	Tác hại trung bình % 14DAT
Dung môi trống (Nước)	S1	0	0	0	0
	S2	0	0	0	0
	S3	0	0	0	0
	S4	0	0	0	0
	S5	0	0	0	0
	CK	0	0	0	0
2240 g ae/ha Muối đimetyl	1				
	S1	6	4	0	0
	S2	11	4	0	0
	S3	3	0	0	0
	S4	46	76	96	100

amoni 2,4-D	2,4-D	S5	53	77	91	100
(4×2,4-D)	1	CK	48	72	94	100
2240 g		S1	10	5	0	0
ae/ha		S2	16	11	6	0
agroxon		S3	7	4	0	0
(4×MCPA)		S4	38	69	87	100
		S5	47	74	92	100
	1	CK	34	61	82	100

Đối với đậu nành, 2240g ae/ha của 2,4-D và agroxon là liều hữu hiệu để phân biệt các cây nhạy cảm với các cây có độ kháng trung bình. Kết quả được trình bày trong Bảng 2 và Hình 5 cho thấy rằng gen 24DT22 mang lại khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cho các cá thể cây đậu nành có khả năng kháng thuốc diệt cỏ cao, đặc biệt là các loại thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, trong khi cả cây đậu nành hoang dại và cây đậu nành biến đổi gen bằng trình tự kiểm chứng không có khả năng kháng thuốc diệt cỏ phenoxy auxin.

Ví dụ 7: Xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp của ngô và biến nạp agrobacterium bằng vector biểu hiện tái tổ hợp

1. Xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp của ngô DBN100764 có chứa trình tự nucleotit 24DT22

Vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-02 (vector backbone: pCAMBIA2301, có sẵn tại Viện CAMBIA) được thủy giải bằng các enzym giới hạn SpeI và KsI. Đoạn trình tự nucleotit 24DT22 được tách được

thắt giữa các vùng hạn chế SpeI và KsaI của vector biểu hiện DBNBC-02 để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764. Đây là một phương pháp thông thường được biết đến rộng rãi để xây dựng vector biểu hiện thông qua việc thủy giải enzym giới hạn. Các vị trí giới hạn SpeI và KsaI trong vector biểu hiện DBNBC-02 cũng được đưa vào bằng cách sử dụng phương pháp thủy giải enzym thông thường. Sơ đồ xây dựng được thể hiện ở Hình 6 (Kan: gen kanamycin; RB: biên phải; Ubi: vùng khởi đầu gen Ubiquitin (Ubiquitin) 1 của bắp (SEQ ID NO: 9), 24DT22: trình tự nucleotit 24DT22 (SEQ ID NO: 1) Nos: vùng kết thúc gen nopalinsynthetaza (SEQ ID NO: 4), PMI: gen phosphomannosyl isomerase (SEQ ID NO: 10), LB: biên trái).

Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 đã được biến nạp vào tế bào E.coli T1 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt như sau: 50 µl tế bào E.coli T1 khả biến và 10 µl ADN plasmit (vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764) được ủ trong bể nước ở 42°C trong 30 giây. Sau đó các tế bào E. coli được ủ trong quá trình nuôi cấy lắc ở 37°C trong 1 giờ (100 vòng/ phút trong máy ủ lắc) và sau đó được nuôi trên đĩa LB cứng (10 g/L Trypton, 5 g/L chiết xuất nấm men, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar và pH được điều chỉnh đến 7,5 bằng NaOH) có chứa 50 mg/L kanamycin (kanamycin) ở 37°C trong 12 giờ. Các khuẩn lạc màu trắng được lấy ra và nuôi lớn trong nước thịt LB (10g/L Trypton, 5 g/L chiết xuất nấm men, 10 g/L NaCl, 50 mg/L kanamycin và pH được điều chỉnh đến 7.5 bằng NaOH) ở 37°C để qua đêm. Các plasmit của chúng đã được chiết tách bằng phương pháp ly giải bằng kiềm. Sau khi các plasmit đã chiết tách được xác thực bằng các enzym giới hạn SpeI và KsaI, các dòng dương tính đã được xác thực thông qua việc xếp trình tự. Kết quả cho thấy trình tự nucleotit giữa các vị trí giới hạn SpeI và KsaI trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 là trình tự nucleotit được thể hiện trong SEQ ID NO: 1 trong danh sách trình tự, tức là trình tự nucleotit 24DT22.

2. Xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp của ngô DBN100764N có chứa trình tự nucleotit kiểm chứng

Tiếp theo quy trình tạo ra vector tạo dòng tái tổ hợp DBN01-T có chứa các trình tự nucleotit 24DT22 được mô tả trong phần 1 của Ví dụ 2, vector tạo dòng tái tổ hợp DBN02R-T có chứa trình tự kiểm chứng đã được xây dựng bằng cách sử dụng trình tự kiểm chứng (SEQ ID NO 8). Các dòng dương tính đã được xác thực thông qua việc xếp trình tự. Kết quả cho thấy rằng trình tự nucleotit kiểm chứng được chèn vào trong vector tạo dòng tái tổ hợp DBN02R-T là trình tự được đề cập trong SEQ ID NO 8 trong danh sách trình tự, cho thấy rằng trình tự nucleotit kiểm chứng đã được chèn một cách chính xác.

Tiếp theo quy trình xây dựng vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 có chứa trình tự nucleotit 24DT22 như được mô tả trong phần 1 của ví dụ 7, vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764N có chứa trình tự tự nhiên đã được xây dựng bằng cách sử dụng trình tự kiểm chứng và quy trình xây dựng được thể hiện trong hình 7 (vector backbone: pCAMBIA2301, có sẵn tại Viện CAMBIA); Kan: gen kanamycin; RB: đường biên phải; ZmUbi1: vùng khởi động gen Ubiquitin (ubiquitin) 1 của ngô (SEQ ID NO: 9); MN: trình tự kiểm chứng (SEQ ID NO: 8); Nos: vùng kết thúc của gen nopal synthetase (SEQ ID NO: 4); PMI: gen phosphomannose-isomerase (SEQ ID NO: 10); LB: đường biên trái). Các dòng dương tính đã được xác thực thông qua việc xếp trình tự. Kết quả cho thấy trình tự kiểm chứng được chèn vào vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764N là trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO 8 trong danh sách trình tự, cho thấy rằng trình tự nucleotit kiểm chứng đã được chèn một cách chính xác.

3. Biến nạp *Agrobacterium tumefaciens* bằng vector biểu hiện tái tổ hợp của ngô

Các vector biểu hiện tái tổ hợp được xây dựng chính xác DBN100764 và DBN100764N (trình tự kiểm chứng) được biến nạp vào *Agrobacterium* LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT: 18313-015) theo phương pháp làm lạnh nhanh bằng ni tơ lỏng như sau: 100 μ L *Agrobacterium* LBA4404 và 3 μ L ADN plasmit (vector biểu hiện tái tổ hợp) được đưa vào ni tơ lỏng và giữ trong 10 phút và sau đó ủ trong bể nước ở 37°C trong 10 phút. Sau đó các tế bào *Agrobacterium* LBA4404 đã biến nạp được cấy trong ống LB và được nuôi cấy ở 28°C, 200 vòng/phút trong 2 giờ và trải trên một đĩa LB chứa 50 mg/L rifampixin (Rifampixin) và 50 mg/L of kanamycin cho đến khi các khuẩn lạc đơn dương tính xuất hiện. Các khuẩn lạc đơn dương tính được lấy ra và nuôi cấy và chiết tách các plasmit của chúng. Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 đã được xác thực bằng các enzym giới hạn SmaI và EcoRV và DBN100764N (trình tự kiểm chứng) đã được xác thực bằng các enzym giới hạn StyI và BglI. Kết quả cho thấy các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 và DBN100764N (trình tự kiểm chứng) đều đúng cấu trúc, tương ứng.

Ví dụ 8: Thu và xác thực cây ngô biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 được chèn vào

Theo phương pháp biến nạp *Agrobacterium* thông thường, giống ngô Zong 31 (Z31) được nuôi cấy trong điều kiện vô trùng và phôi cây non được nuôi cấy đồng thời với các dòng *Agrobacterium* được xây dựng trong phần 3 của Ví dụ 7 để đưa ADN-T vào các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100764 và DBN100764N (trình tự kiểm chứng) được xây dựng trong phần 1 và phần 2 của Ví dụ 7 (bao gồm trình tự khởi động của gen Ubiquitin 1 của ngô, trình tự nucleotit 24DT22, trình tự nucleotit kiểm chứng, gen PMI và trình tự kết thúc Nos) vào bộ gen ngô. Thu được các cây ngô có chứa trình tự nucleotit 24DT22 và trình tự nucleotit kiểm chứng tương ứng và đồng thời cây ngô hoang dại được lấy làm cây kiểm chứng.

Đối với việc biến đổi gen cây ngô qua trung gian *Agrobacterium*, mô tả ngắn gọn, phôi non ngô chưa trưởng thành được phân tách từ ngô và cho tiếp xúc với thể rắn *Agrobacterium*, trong đó *Agrobacterium* có thể đưa trình tự nucleotit 24DT22 vào ít nhất một tế bào của một phôi non. (Bước 1: Bước gây nhiễm khuẩn). Trong bước này, tốt nhất là, phôi non được ngâm trong dung dịch *Agrobacterium* ($OD_{660} = 0,4 \sim 0,6$, môi trường nhiễm khuẩn (4,3 g/L muối MS, các vitamin MS, 300 mg/L casein, 68.5 g/L sucroza, 36 g/L glucoza, 40 mg/L of Acetosyringone (AS), 1 mg/L 2,4-điclorophenoxyaxetic axit (2,4-D), pH=5,3)) để khởi đầu việc nuôi cấy. Phôi non và *Agrobacterium* được nuôi cấy đồng thời trong một khoảng thời gian (3 ngày) (Bước 2: Bước nuôi cấy đồng thời). Tốt nhất là, phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn (4.3 g/L muối MS, vitamin MS, 300 mg/L casein, 20 g/L sucroza, 10 g/L glucoza, 100 mg/L Acetosyringone (AS), 1 mg/L 2,4-điclorophenoxyaxetic axit (2,4-D) và 8 g/L Agar, pH = 5,8) sau bước gây nhiễm khuẩn. Sau bước nuôi cấy đồng thời này, bước " hồi phục" có chọn lọc có thể được tiến hành. Trong bước " hồi phục", môi trường hồi phục (4,3 g/L muối MS, vitamin MS, 300 mg/L casein, 30 g/L sucroza, 1 mg/L 2,4-điclorophenoxyaxetic axit (2,4-D) và 3g/L phytagel, pH = 5,8) có chứa ít nhất một loại kháng sinh ức chế *Agrobacterium* đã biết (xephalosporin) mà không có tác nhân chọn lọc đối với chất chuyển nạp của cây (Bước 3: Bước phục hồi). Tốt nhất là, phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn có chứa kháng sinh nhưng không có tác nhân chọn lọc để loại bỏ *Agrobacterium* và cung cấp thời gian phục hồi cho các tế bào bị nhiễm khuẩn. Sau đó, phôi non đã nhiễm khuẩn được nuôi cấy trên môi trường có chứa tác nhân chọn lọc (manozax) và thể rắn đang phát triển, đã biến đổi, được chọn (Bước 4: bước chọn lọc). Tốt nhất là, phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn chọn lọc có chứa tác nhân chọn lọc (4.3 g/L muối MS, vitamin MS, 300 mg/L casein, 30 g/L sucroza, 12,5g/L manozax, 1 mg/L 2,4-điclorophenoxyaxetic axit (2,4-D) và 3g/L phytagel, pH = 5,8), kết quả thu được là sự tăng trưởng chọn lọc của các tế bào biến đổi. Sau đó, thể rắn tái

sinh thành cây (Bước 5: Bước tái sinh). Tốt nhất là, thể sản được nuôi cấy trên môi trường rắn chứa tác nhân chọn lọc (môi trường phân hóa MS và môi trường bén rễ MS) để tái sinh thành cây.

Thể sản có khả năng kháng đã thu được được chuyển sang môi trường phân hóa MS (4,3 g/L muối MS, vitamin MS, 300 mg/L casein, 30 g/L sucroza, 2 mg/L 6-benzyladenine, 5 g/L manosa và 3g/L phytigel, pH = 5,8) và được nuôi cấy và phân hóa ở 25°C. Các giống đã phân hóa được chuyển vào môi trường bén rễ MS nói trên (2,15 g/L muối MS, vitamin MS, 300 mg/L casein, 30 g/L sucroza, 1 mg/L indole-3-acetic acid và 3g/L phytigel, pH = 5,8) và được trồng đến độ cao khoảng 10 cm ở 25°C. Tiếp theo, cây con được chuyển đến và trồng trong nhà kính cho đến khi ra quả. Trong nhà kính, cây ngô được trồng ở 28°C trong 16 giờ và ở 20°C trong 8 giờ mỗi ngày.

2. Xác thực cây ngô biến đổi gen bằng gen 24DT22 được chèn vào bằng kỹ thuật TaqMan

100 mg lá của tất cả các cây ngô biến đổi (cây ngô được biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 hoặc trình tự nucleotit kiểm chứng, tương ứng) được lấy làm mẫu tương ứng. Bộ gen ADN của chúng đã được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen) và số lượng bản sao của gen PMI đã được định lượng bằng phép phân tích định lượng huỳnh quang dựa trên đoạn dò Taqman PCR để xác định số lượng bản sao của 24DT22. Cây ngô hoang dại được lấy làm cây kiểm chứng và được phân tích dựa theo các quy trình như mô tả bên trên. Các thử nghiệm được thực hiện trong ba lần và lấy giá trị trung bình làm kết quả.

Phương pháp cụ thể để phát hiện số lượng bản sao của gen PMI được mô tả như sau:

Bước 31: 100 mg lá của mỗi cây ngô biến đổi gen (cây ngô biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 hoặc trình tự nucleotit kiểm chứng tương ứng) và cây ngô hoang dại đã được lấy và nghiền thành thể đồng nhất trong cối giã trong nitơ lỏng. Mỗi mẫu thực hiện ba lần;

Bước 32: các ADN bộ gen của các mẫu trên đã được chiết tách bằng cách sử dụng DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) theo hướng dẫn trên sản phẩm;

Bước 33: nồng độ ADN của bộ gen của các mẫu trên được xác định bằng cách sử dụng NanoDrop 2000 (Thermo Scientific);

Bước 34: nồng độ ADN của bộ gen được điều chỉnh đến cùng phạm vi 80-100 ng/μl;

Bước 35: Số lượng bản sao của các mẫu được định lượng bằng phép phân tích định lượng huỳnh quang dựa trên đoạn dò Taqman PCR, mẫu định lượng với số lượng bản sao đã biết được lấy làm mẫu chuẩn và cây ngô hoang dại được dùng làm mẫu kiểm chứng. Quy trình này được thực hiện trong ba lần cho mỗi mẫu và lấy giá trị trung bình làm kết quả. Các đoạn mồi và các đoạn dò được sử dụng trong phép phân tích định lượng huỳnh quang PCR được thể hiện như sau:

Các đoạn mồi và đoạn dò sau đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit PMI:

Primer 3: GCTGTAAGAGCTTACTGAAAAAATTAACA như được thể hiện trong SEQ ID NO: 14 trong danh sách trình tự;

Primer 4: CGATCTGCAGGTCGACGG như được thể hiện trong SEQ ID NO: 15 trong danh sách trình tự;

Đoạn dò 2: TCTCTTGCTAAGCTGGGAGCTCGATCC như được thể hiện trong SEQ ID NO: 16 trong danh sách trình tự;

Hệ thống phản ứng PCR:

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10µL
50 × đoạn mồi/ đoạn dò	1µL
ADN bộ gen	3µL
Nước (ddH ₂ O)	6µL

Hỗn hợp 50 × đoạn mồi/ đoạn dò có chứa 45 µL mỗi đoạn mồi (1 mM), 50 µL đoạn dò (100 µM) và 860 µL của 1 x dung dịch đệm TE và được bảo quản trong một ống màu hổ phách ở 4°C.

Điều kiện phản ứng PCR:

Bước	Nhiệt độ	Thời gian
41	95°C	5 phút
42	95°C	30 giây
43	60°C	1 phút
44	Quay về bước 42, lặp lại 40 lần	

Sử dụng phần mềm SDS2.3 (Applied Biosystems) để phân tích dữ liệu.

Kết quả thử nghiệm cho thấy tất cả các trình tự nucleotit của trình tự nucleotit 24DT22 và trình tự nucleotit kiểm chứng đã được tích hợp vào bộ gen của các cây ngô được dò tìm, tương ứng. Hơn nữa, tất cả các cây ngô đã biến

đổi trình tự nucleotit 24DT22 và trình tự nucleotit kiểm chứng chứa một bản sao của gen 24DT22 tương ứng.

Ví dụ 9: Thử nghiệm về hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ của cây ngô biến đổi gen

Các thử nghiệm hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ đối với muối đimetyl amoni 2,4-D và agroxon của cây ngô có chứa trình tự nucleotit 24DT22, trình tự nucleotit kiểm chứng, tương ứng và cây ngô hoang dại (giai đoạn V3 - V4) được thực hiện tương ứng.

Các cây ngô có chứa trình tự nucleotit 24DT22, trình tự nucleotit kiểm chứng tương ứng và các cây ngô hoang dại đã được lấy ra và được phun với muối đimetyl amoni 2,4-D (8960g ae/ha, gấp 16 lần nồng độ trên đồng ruộng), agroxon (8960g ae/ha, gấp 16 lần nồng độ trong ruộng) và dung môi trống (nước) tương ứng. Sự phát triển của rễ chùm được tính 21 ngày sau khi phun. Ba giống (S6, S7 và S8) của cây ngô được biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22, hai giống (S9 và S10) của cây ngô biến đổi gen bằng trình tự nucleotit kiểm chứng và 1 giống ngô hoang dại (CK2) được chọn và 10-15 cây từ mỗi giống được kiểm tra. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3 Kết quả kiểm tra hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ của cây ngô biến đổi gen T1

Phương pháp xử lý	Bộ gen của ngô	Sự phát triển thường của rễ phụ	Sự phát triển bình thường của rễ phụ	Sự phát triển không bình thường của rễ phụ	Tỷ lệ phát triển bình thường của rễ phụ
-------------------	----------------	---------------------------------	--------------------------------------	--	---

Dung môi trồng (Nước)	S6	11	0	100,00%
	S7	12	0	100,00%
	S8	11	0	100,00%
	S9	13	0	100,00%
	S10	11	0	100,00%
	CK2	14	0	100,00%
8960g ae/ha Muối đimetyl amoni 2,4-D (16×2,4-D)	S6	12	0	100,00%
	S7	12	0	100,00%
	S8	10	0	100,00%
	S9	0	13	0%
	S10	0	14	0%
	CK2	0	15	0%
8960g ae/ha agroxon (16×MCPA)	S6	13	0	100,00%
	S7	14	0	100,00%
	S8	13	0	100,00%
	S9	0	12	0%
	S10	0	11	0%
	CK2	0	14	0%

Kết quả trong Bảng 3 cho thấy gen 24DT22 mang lại cho cây ngô biến đổi gen khả năng kháng cao đối với thuốc diệt cỏ, đặc biệt là đối với các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin (vì cây có một lá mầm vốn đã có khả năng chống chịu nhất định đối với các loại thuốc diệt cỏ phenoxy auxin, khả năng kháng xuất hiện ở mức cao); trong khi không có cây ngô hoang dại và cây ngô biến đổi bằng trình tự kiểm chứng nào cho thấy mức độ kháng cao đối với thuốc diệt cỏ.

Tất cả các trình bày trên đây, cây ngô, cây đậu nành và cây họ Cải (*Arabidopsis thaliana*) được biến đổi gen bằng trình tự nucleotit 24DT22 có khả

năng kháng thuốc diệt cỏ cao. Các codon được ưu tiên của cây được sử dụng trong gen kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 theo sáng chế, kết quả là gen kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế là phù hợp để được biểu hiện trên cây trồng. Protein kháng thuốc diệt cỏ 24DT22 theo sáng chế có phổ kháng thuốc diệt cỏ rộng, đặc biệt là các thuốc diệt cỏ phenoxy auxin.

Cuối cùng, điều cần giải thích là tất cả các ví dụ trên chỉ đơn thuần nhằm mục đích minh họa cho các giải pháp kỹ thuật của sáng chế chứ không phải nhằm hạn chế sáng chế. Mặc dù mô tả chi tiết của sáng chế này có đề cập đến các ví dụ thích hợp nhất, người có kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rằng các giải pháp kỹ thuật của sáng chế có thể được sửa đổi hoặc thay thế tương đương nhưng vẫn nằm trong và phạm vi của sáng chế.

Yêu cầu bảo hộ

1. Protein kháng thuốc diệt cỏ, bao gồm protein bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện trong SEQ ID NO: 2.

2. Gen kháng thuốc diệt cỏ, bao gồm:

- (a) trình tự nucleotit mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 1; hoặc
- (b) trình tự nucleotit bổ sung hoàn toàn với các trình tự nucleotit tại (a); hoặc
- (c) trình tự nucleotit được thể hiện tại SEQ ID NO:1.

3. Phương pháp mở rộng phạm vi mục tiêu của thuốc diệt cỏ, bao gồm: đồng biểu hiện protein kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 1 trong một cây trồng với ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein khác với protein kháng thuốc diệt cỏ.

4. Phương pháp mở rộng phạm vi mục tiêu của thuốc diệt cỏ theo điểm 3, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein kháng glyphosat, protein kháng glufosinat amoni, dioxygenaza axit 4-hydroxyphenylpyruvic, syntaza axetolactat, protein xylocrom hoặc protoporphyrinogen oxidaza.

5. Phương pháp lựa chọn các tế bào thực vật biến đổi gen, bao gồm biến đổi nhiều tế bào thực vật có trình tự nucleotit mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 1, và nuôi cấy nhiều tế bào thực vật trong nồng độ thuốc diệt cỏ phenoxy auxin cho phép sự tăng trưởng của các tế bào thực vật biến đổi biểu hiện trình tự nucleotit mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ trong khi làm chết các tế bào thực vật không biến đổi hoặc ức chế sự phát triển của các tế bào thực vật không biến đổi.

6. Phương pháp lựa chọn các tế bào thực vật biến đổi gen theo điểm 5, trong đó tế bào thực vật biến đổi gen được lựa chọn từ nhóm bao gồm đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường hoặc mía.

7. Phương pháp lựa chọn các tế bào thực vật biến đổi gen theo điểm 5, trong đó thuốc diệt cỏ phenoxy auxin bao gồm 2,4-D hoặc MCPA.

8. Phương pháp kiểm soát cỏ dại, bao gồm sử dụng một lượng hữu hiệu thuốc diệt cỏ trên cây trồng bao gồm trình tự nucleotit mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 1.

9. Phương pháp kiểm soát cỏ dại theo điểm 8, trong đó cây trồng được lựa chọn từ nhóm bao gồm đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường hoặc mía.

10. Phương pháp kiểm soát cỏ dại theo điểm 8, trong đó thực vật có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosate.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó thuốc diệt cỏ bao gồm thuốc diệt cỏ phenoxy auxin và thuốc diệt cỏ glyphosate.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó thuốc diệt cỏ phenoxy auxin bao gồm 2,4-D hoặc MCPA.

13. Phương pháp bảo vệ thực vật khỏi tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ, bao gồm đưa trình tự nucleotit mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 1, vào thực vật, làm cho thực vật thu được sản xuất một lượng protein kháng thuốc

diệt cỏ đủ để bảo vệ thực vật thu được khỏi những tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ phenoxy auxin.

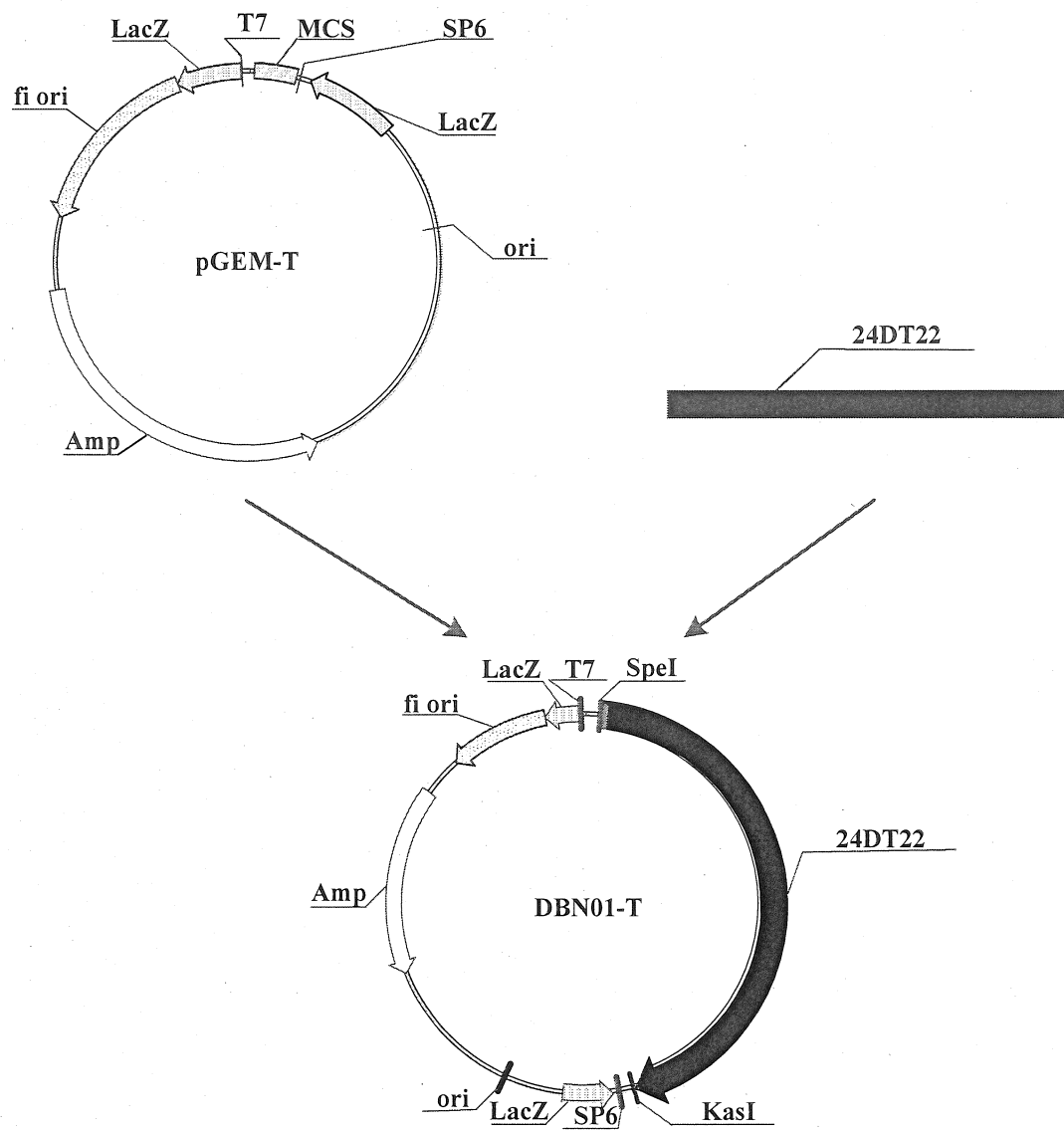
14. Phương pháp bảo vệ thực vật khỏi tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ theo điểm 13, trong đó thực vật được lựa chọn từ nhóm bao gồm đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường hoặc mía.

15. Phương pháp bảo vệ thực vật khỏi tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ theo điểm 13, trong đó thuốc diệt cỏ phenoxy auxin bao gồm 2,4-D hoặc MCPA.

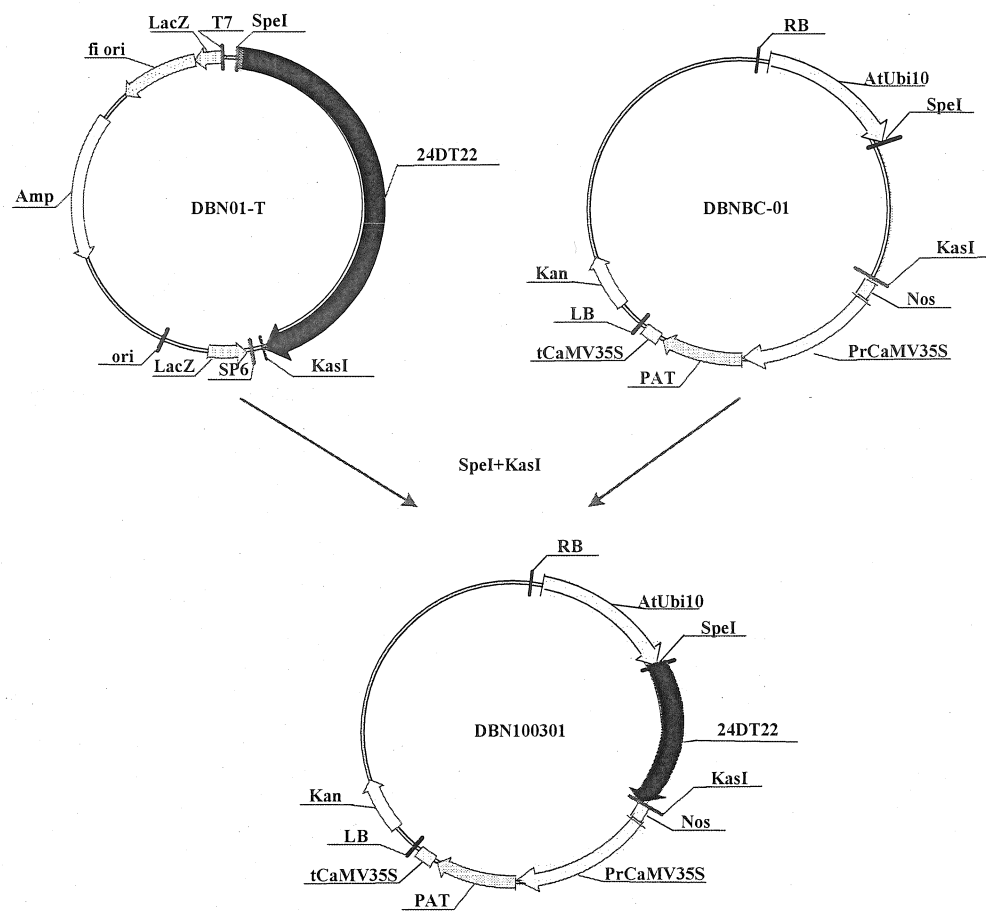
16. Phương pháp tạo cho thực vật tính kháng thuốc diệt cỏ bao gồm đưa trình tự nucleotit mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 1 vào thực vật.

17. Phương pháp tạo cho thực vật tính kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 16, trong đó thực vật được lựa chọn từ nhóm bao gồm đậu nành, bông, ngô, lúa, lúa mì, củ cải đường và mía.

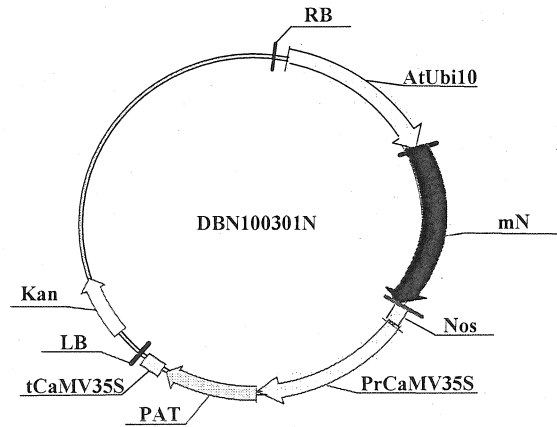
18. Phương pháp tạo cho thực vật tính kháng thuốc diệt cỏ theo điểm 16, trong đó thuốc diệt cỏ bao gồm 2,4-D hoặc MCPA.



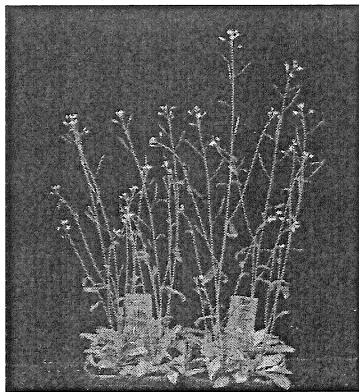
Hình 1



Hình 2



Hình 3



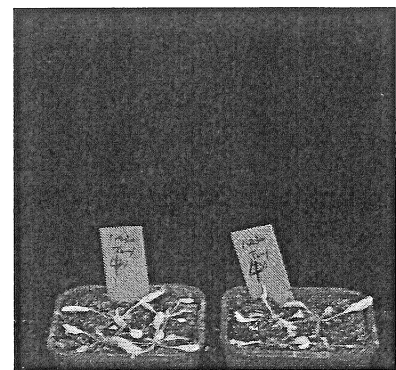
1×2,4-D 1×MCPA

24DT22



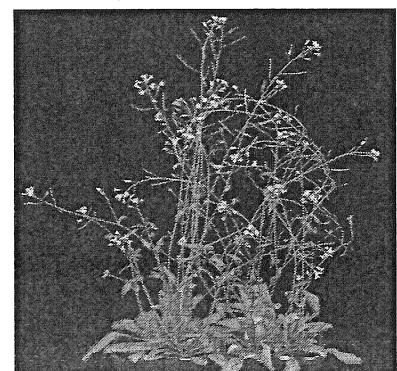
Nước

24DT22



1×2,4-D 1×MCPA

Hoang dã



Nước

Hoang dã

Hình 4

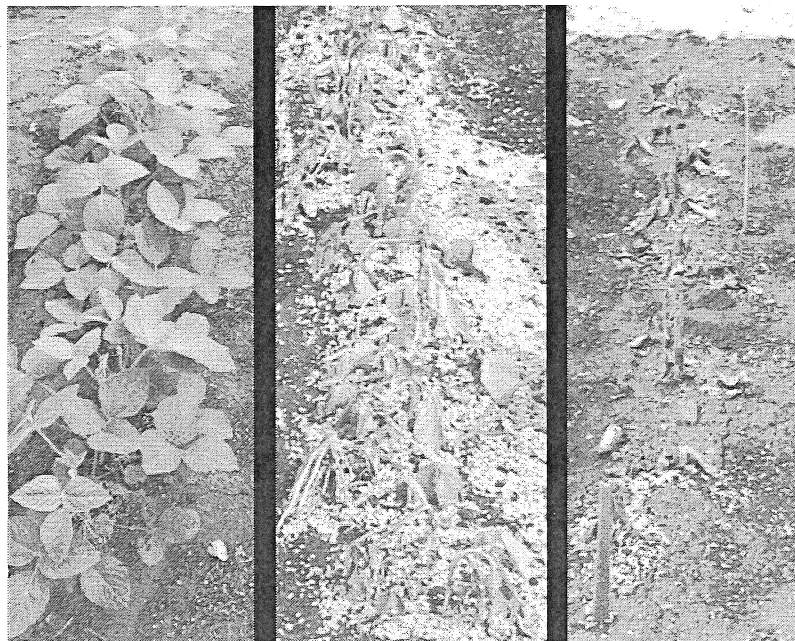


24DT22

Trình tự kiểm chứng

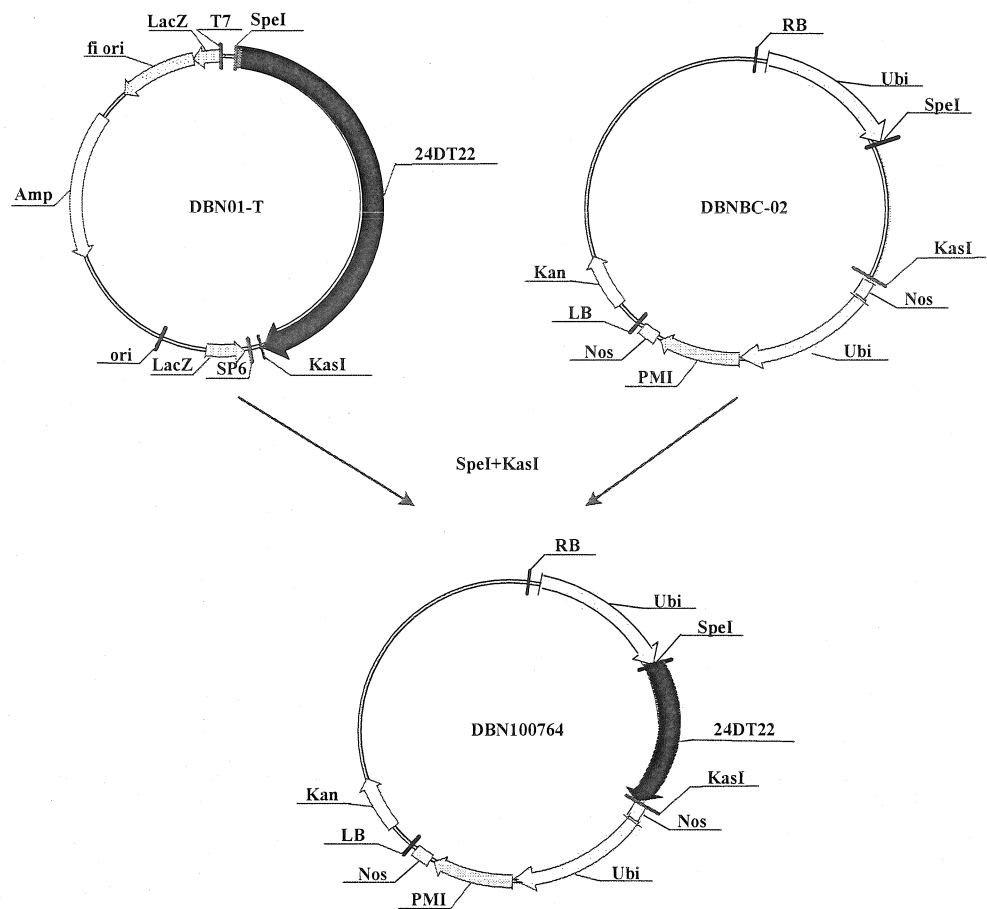
Hoang dã

Nước

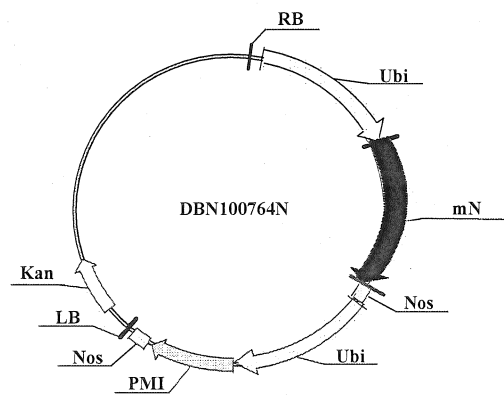


24DT22 Trình tự kiểm chứng Hoang dã
4X 2,4-D

Hình 5



Hình 6



Hình 7

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Beijing Da Bei Nong Technology Group Co., Ltd.
 <120> Protein kháng thuốc diệt cỏ, gen mã hóa, phương pháp bảo vệ thực vật khỏi tác hại gây ra bởi thuốc diệt cỏ
 <130> DBNBC75
 <160> 16
 <170> Sáng chế phiên bản 3.5

- <210> 1
 <211> 879
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự 24DT22 nucleotit

<400> 1
 atgtctccgg catttgatat tgctcctctt gacgctacct ttggtgctgt cgttacgggt
 60
 gtgaaactgg ctgaccttga tgacgctggc tggctcgatc tgcaggcagc ctggcttcaa
 120
 catgcactct tgatcttccc tgggcaacac ctacgcaatg accaacagat tacctttgct
 180
 aaacgctttg gagcaattga gaggattggc ggaggtgaca ttgttgccat atccaatgtc
 240
 aaggcagatg gcacagtgcg ccagcactct cctgctgagt gggatgacat gatgaaggtc
 300
 attgtgggca acatggcctg gcacgccgac tcaacctaca tgccagtcac ggctcaagga
 360

gctgtgttca ggcgagaagt tgtcccagca gttgggggca gaacctgctt tgctgacatg
 420
 agggcagcct acgatgccct tgatgaggca acccgtgctc ttgtcacca aaggtctgct
 480
 cgtcactccc ttgtgtattc tcagagcaag ttgggacatg tccaacaggc cgggtcagcc
 540
 tacataggtt atggcatgga caccactgca actcctctca gaccattggt caaggtgcat
 600
 cctgagactg gaaggcccag cctcttgatc ggccgccatg cccatgccat ccctggcatg
 660
 gatgcagctg aatcagagcg cttccttgaa ggacttgttg actgggcctg ccaggctccc
 720
 agagtccatg ctcaccaatg ggctgctgga gatgtggttg tgtgggacaa ccgctgtttg
 780
 ctccaccgtg ctgagccctg ggatttcaag ttgccacgtg tgatgtggca ctccagactc
 840
 gctggacgcc cagaaactga ggggtgctgcc ttggtttga
 879

<210> 2
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự 24DT22 nucleotit

<400> 2

Met Ser Pro Ala Phe Asp Ile Ala Pro Leu Asp Ala Thr Phe Gly Ala

1

5

10

15

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

245 250 255
 Asn Arg Cys Leu Leu His Arg Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys Leu Pro
 260 265 270
 Arg Val Met Trp His Ser Arg Leu Ala Gly Arg Pro Glu Thr Glu Gly
 275 280 285
 Ala Ala Leu Val
 290

<210> 3
 <211> 1322
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
 gtcgacctgc aggtcaacgg atcaggatat tcttgtttaa gatgttgaac tctatggagg
 60
 ttgtatgaa ctgatgatct aggaccggat aagttccctt cttcatagcg aacttattca
 120
 aagaatgttt tgtgtatcat tcttgttaca ttgtattaa tgaaaaaata ttattgggtca
 180
 ttggactgaa cacgagtgtt aaatatggac caggccccaa ataagatcca ttgatatatg
 240
 aattaaataa caagaataaa tcgagtcacc aaaccacttg ccttttttaa cgagacttgt
 300
 tcaccaactt gatacaaaag tcattatcct atgcaaatac ataatcatac aaaaatatcc
 360
 aataacacta aaaaattaaa agaaatggat aatttcacaa tatgttatac gataaagaag
 420
 ttacttttcc aagaaattca ctgattttat aagcccactt gcattagata aatggcaaaa

480

aaaaacaaaa aggaaaagaa ataaagcacg aagaattcta gaaaatacga aatacgcttc

540

aatgcagtgg gaccacggt tcaattattg ccaattttca gctccaccgt atatttaaaa

600

aataaaacga taatgctaaa aaaatataaa tcgtaacgat cgtaaattct caacggctgg

660

atcttatgac gaccgttaga aattgtggtt gtcgacgagt cagtaataaa cggcgtcaaa

720

gtggttgcag ccggcacaca cgagtcgtgt ttatcaactc aaagcacaaa tacttttct

780

caacctaaaa ataaggcaat tagccaaaaa caacttgcg tgtaaacaac gctcaatata

840

cgtgtcattt tattattagc tattgcttca ccgccttagc tttctcgtga cctagtcgtc

900

ctcgtctttt cttcttcttc ttctataaaa caatacccaa agcttcttct tcacaattca

960

gatttcaatt tctcaaaatc ttaaaaactt tctctcaatt ctctctaccg tgatcaagg

1020

aaatttctgt gttccttatt ctctcaaaat cttcgatttt gtttcggtc gatcccaatt

1080

tcgtatatgt tctttgggtt agattctgtt aatcttagat cgaagacgat tttctgggtt

1140

tgatcgtag atatcatctt aattctcgat tagggtttca taaatatcat ccgatttgtt

1200

caaataattt gagttttgtc gaataattac tcttcgattt gtgatttcta tctagatctg

1260

gtgttagttt ctagtgtgtg cgatcgaatt tgtcgattaa tctgagtttt tctgattaac

1320

ag

1322

<210> 4

<211> 253

<212> DNA

<213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 4

gatcgttcaa acatttgga ataaagttc ttaagattga atcctgtgc cggcttgcg

60

atgattatca tataattct gttgaattac gtttagcatg taataattaa catgtaatgc

120

atgacgttat ttatgagatg ggttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac

180

gcatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct

240

atgttactag atc

253

<210> 5

<211> 530

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 5

ccatggagtc aaagattcaa atagaggacc taacagaact cgccgtaaag actggcgaac

60

agttcataca gactcttta cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg

120

agcacgacac gcttgtctac tccaaaaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg

180

caattgagac tttcaacaa agggtaatat ccggaaacct cctcggattc cattgcccag

240

ctatctgtca ctttattgtg aagatagtgg aaaaggaagg tggctcctac aaatgccatc

300

attgcgataa aggaaaggcc atcgttgaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg

360

gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc

420

aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt

480

cgcaagaccc ttcctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca

530

<210> 6

<211> 552

<212> DNA

<213> Streptomyces viridochromogenes

<400> 6

atgtctccgg agaggagacc agttgagatt aggccagcta cagcagctga tatggccgcg

60

gtttgtgata tcgttaacca ttacattgag acgtctacag tgaactttag gacagagcca

120

caaacaccac aagagtggat tgatgatcta gagagggtgc aagatagata cccttggttg

180

gttgctgagg ttgaggggtg tgtggctggg attgcttacg ctgggccctg gaaggctagg

240

aacgcttacg attggacagt tgagagtact gtttacgtgt cacataggca tcaaagggtg

300

ggcctaggat ccacattgta cacacatttg ctttaagtcta tggaggcgca aggttttaag

360

tctgtggttg ctgttatagg ccttcaaac gatccatctg ttaggttgca tgaggcttg

420

ggatacacag cccgggggtac attgcgcgca gctggataca agcatggtgg atggcatgat

480

gttggttttt ggcaaaggga tttgagttg ccagctctc caaggccagt taggccagtt

540

accagatct ga

552

<210> 7

<211> 195

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 7

ctgaaatcac cagtctctct ctacaaatct atctctctct ataataatgt gtgagtagtt

60

cccagataag ggaattaggg ttcttatagg gtttcgctca tgtgttgagc atataagaaa

120

cccttagtat gtatttgat ttgtaaaata cttctatcaa taaaatttct aattcctaaa

180

accaaaatcc agtgg

195

<210> 8
 <211> 1848
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự kiểm soát

<400> 8
 atggacaaca acccaaacat caacgaatgc attcataca actgcttgag taaccagaa
 60
 gttgaagtac ttggtggaga acgcattgaa accggttaca ctcccatcga catctccttg
 120
 tccttgacac agtttctgct cagcgagttc gtgccagggtg ctgggttcgt tctcggacta
 180
 gttgacatca tctgggggtat ctttgggtcca tctcaatggg atgcattcct ggtgcaaatt
 240
 gagcagttga tcaaccagag gatcgaagag ttcgccagga accaggccat ctctaggttg
 300
 gaaggattga gcaatctcta ccaaattctat gcagagagct tcagagagtg ggaagccgat
 360
 cctactaacc cagctctccg cgaggaaatg cgtattcaat tcaacgacat gaacagcgcc
 420
 ttgaccacag ctatcccatt gttcgcagtc cagaactacc aagttcctct cttgtccgtg
 480
 tacgttcaag cagctaattt tcacctcagc gtgcttcgag acgttagcgt gtttgggcaa
 540
 aggtgggggat tcgatgctgc aaccatcaat agccgttaca acgaccttac taggctgatt
 600
 ggaaactaca ccgaccacgc tgttcgttgg tacaacactg gcttggagcg tgtctgggggt

660

cctgattcta gagattggat tagatacaac cagttcagga gagaattgac cctcacagtt

720

ttggacattg tgtctctctt cccgaactat gactccagaa cctaccctat ccgtacagtg

780

tcccaactta ccagagaaat ctatactaac ccagttcttg agaacttoga cggtagcttc

840

cgtggttctg cccaaggtat cgaaggctcc atcaggagcc cacacttgat ggacatcttg

900

aacagcataa ctatctacac cgatgctcac agaggagagt attactggtc tggacaccag

960

atcatggcct ctccagttgg attcagcggg cccgagttta cctttctct ctatggaact

1020

atgggaaacg ccgctccaca acaacgtatc gttgctcaac taggtcaggg tgtctacaga

1080

accttgtctt ccaccttgta cagaagaccc ttcaatatcg gtatcaacaa ccagcaactt

1140

tccgttcttg acggaacaga gttgcctat ggaacctctt ctaactgcc atccgctgtt

1200

tacagaaaga gcggaaccgt tgattccttg gacgaaatcc caccacagaa caacaatgtg

1260

ccaccaggc aaggattctc ccacaggttg agccacgtgt ccatgttccg ttccgattc

1320

agcaacagtt ccgtgagcat catcagagct cctatgttct catggattca tcgtagtgct

1380

gagttcaaca atatcattcc ttctctcaa atcacccaaa tccattgac caagtctact

1440

aaccttgat ctggaacttc tgtcgtgaaa ggaccaggct tcacaggagg tgatattctt

1500

agaagaactt ctctggcca gattagcacc ctgagagta acatcactgc accactttct

1560

caaagatatt ggttcaggat tcgttacgca tctaccacta acttgcaatt ccacacctcc

1620

atcgacggaa ggcctatcaa tcagggtaac ttctccgcaa ccatgtcaag cggcagcaac

1680

ttgcaatccg gcagcttcag aaccgtcggg ttactactc ctttcaactt ctctaacgga

1740

tcaagcggtt tcacccttag cgctcatgtg ttcaattctg gcaatgaagt gtacattgac

1800

cgtattgagt ttgtgcctgc cgaagttacc ttgaggctg agtactga

1848

<210> 9

<211> 1992

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 9

ctgcagtga gcgtagcccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgcta

60

agttataaaa aattaccaca tttttttt gtcacacttg ttgaagtgc agttatcta

120

tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa

180

tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagttagac atgggtctaaa ggacaattga

240

gtattttgac aacaggactc tacagtttta tctttttagt gtgcattgtt tctcctttt

300

tttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg
360
gtttaggggt aatggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt
420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttatttaat aatttagata
480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaacaaat accctttaag aaattaaaaa
540
aactaaggaa acatttttct tgttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga
600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcgggcaa gcgaagcaga
660
cggcacggca tctctgtcgc tgcctctgga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg
720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac
780
ggcaggcggc ctctctctcc tctcacggca cggcagctac gggggattcc ttcccaccg
840
ctcctcgct ttcccttctc cgcccgccgt aataaataga caccctctcc acaccctctt
900
tccccaacct cgtgtgttc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattcac
960
ccgtcggcac ctccgcttca aggtacgccg ctctctctcc cccccccc ctctctacct
1020
tctctagatc ggcgttccg tccatggta gggcccgga gttctacttc tgttcattt
1080
tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgctgctagc gttcgtacac ggatgcgacc
1140
tgtacgtcag acacgttctg attgctaact tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg

1200

atggctctag ccgtccgca gacgggatcg atttcatgat ttttttggt tcgtgcata

1260

gggtttgggt tgccctttc cttatttca atatatgccg tgcacttgt tgcgggtca

1320

tctttcatg ctttttttg tcttggtgt gatgatgtgg tctggtggg cggtcgttct

1380

agatcggagt agaattctgt ttcaaactac ctggtggatt tattaattt ggatctgtat

1440

gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta

1500

ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg cttttgttc

1560

gcttggtgt gatgatgtgg tgtggtggg cggtcgttca ttogttctag atcggagtag

1620

aatactgttt caaactacct ggtgtattta ttaatttgg aactgtatgt gtgtgcata

1680

catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg

1740

ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgt

1800

ctaacctga gtacctatct attataataa acaagtatgt ttataatta tttgatctt

1860

gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttag ccctgccttc

1920

atacgctatt tatttgcttg gtactgttcc tttgtcgat gctcaccctg ttgttggtg

1980

ttacttctgc ag

1992

<210> 10
<211> 1176
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 10
atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact
60
gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggacga
120
catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgttc actgcgtgat
180
gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaacg ctttggcgaa
240
ctgcctttcc tgtcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca
300
aacaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat
360
gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggttt tgcgctgacg
420
ccttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa tttccgaga ttgtctcct actccagccg
480
gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac ttttacaac agcctgatgc cgaacgttta
540
agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg cagggatgaag aaaaatcccg cgcgctggcg
600
attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt
660

tctgaatttt acccggaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa

720

ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc

780

gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa

840

tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag

900

ttgttgacct agccggtgaa acaaggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat

960

tttgccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc

1020

gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttgtgga aaggttctca gcagttacag

1080

cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc

1140

cacggccgtt tagcgcgtgt ttacaacaag ctgtaa

1176

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> primer1

<400> 11

gaggggtgttg tggctggtat tg

22

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> primer2

<400> 12

tctcaactgt ccaatcgtaa gcg

23

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> probe 1

<400> 13

cttacgctgg gccctggaag gctag

25

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> primer3

<400> 14

gctgtaagag cttactgaaa aaattaaca

29

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> primer4

<400> 15

cgatctgcag gtcgacgg

18

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> probe 2

<400> 16

tctcttgcta agctgggagc tcgatcc

27