



(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)



1-0036044

(51)⁸ C12N 9/02; C12N 5/04; A01H 5/00;
C12N 15/82

(13) B

(21) 1-2018-00747

(22) 29/07/2016

(86) PCT/US2016/044774 29/07/2016

(87) WO2017/023778 09/02/2017

(30) 62/200,428 03/08/2015 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/05/2018 362A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America

(72) EVDOKIMOV, Artem, G. (US); LARUE, Clayton, T. (US); MOSHIRI, Farhad (US); ZHOU, Xuefeng (CN); REAM, Joel, E. (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, CẤU TRÚC ADN VÀ CÂY HOẶC MỘT PHẦN CỦA CÂY CHỨA PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP TRUYỀN TÍNH DUNG NẠP THUỐC DIỆT CỎ CHO CÂY HOẶC MỘT PHẦN CỦA CÂY

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học và đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp mới và các protein đã được xử lý để đem lại khả năng dung nạp đối với các thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza. Sáng chế còn đề xuất các thực vật, hạt, tế bào, và phần của thực vật chuyển gen dung nạp thuốc diệt cỏ chứa các phân tử ADN tái tổ hợp, cũng như các phương pháp sử dụng chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa các enzym mà tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ mà ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sản xuất các cây trồng nông nghiệp thường sử dụng các tính trạng chuyển gen đã được tạo ra bằng cách áp dụng các phương pháp công nghệ sinh học. Một gen khác nguồn gốc, còn được gọi là gen chuyển, có thể được đưa vào thực vật để tạo ra tính trạng chuyển gen. Sự biểu hiện của gen chuyển ở thực vật truyền tính trạng, như dung nạp thuốc diệt cỏ, cho thực vật đó. Các ví dụ về các tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ chuyển gen bao gồm tính trạng dung nạp glyphosat, dung nạp glufosinat, và dung nạp dicamba. Cùng với sự gia tăng các loài cỏ kháng các thuốc diệt cỏ thường được sử dụng, các tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ mới là cần thiết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thuốc diệt cỏ được đặc biệt quan tâm bao gồm các thuốc diệt cỏ mà ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO), được gọi là các thuốc diệt cỏ PPO. Các thuốc diệt cỏ PPO cho phép phòng trừ một loạt loại cỏ kháng thuốc diệt cỏ, nhờ đó khiến cho tính trạng đem lại khả năng dung nạp đối với các thuốc diệt cỏ này là đặc biệt hữu ích trong hệ thống luân canh kết hợp với một hoặc nhiều tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ khác.

Protoporphyrinogen oxidaza thực hiện chức năng trong cả chu trình sinh tổng hợp diệp lục và hem khi nó chuyển hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX. Sau khi tạo ra protoporphyrin IX, các chu trình sinh tổng hợp diệp lục và hem phân hóa khi các ion kim loại khác nhau được đưa vào (sắt đối với hem và magie đối với diệp lục). Các phân đoạn của chu trình này được bảo toàn qua các sinh vật chưa có nhân điển hình và các sinh vật có nhân chuẩn, và nhiều enzym PPO tìm thấy ở các sinh vật chưa có nhân điển hình và các sinh vật có nhân chuẩn là khá tương tự. Một số sinh vật chưa có nhân điển hình (ví dụ, vi khuẩn xyan) sử dụng chu trình này để sản sinh diệp lục và hem trong khi các sinh vật

chưa có nhân điển hình khác (ví dụ, *Escherichia coli*) sử dụng chu trình này để sản sinh hem.

Các protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ ("iPPO") đã được phân lập từ nhiều sinh vật chưa có nhân điển hình và sinh vật có nhân chuẩn. Trên cơ sở cấu trúc, tin rằng có ít nhất ba phân nhóm enzym PPO khác biệt: HemY (xem tài liệu: Hansson and Hederstedt, "Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* hemEHY gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes" *Journal of Bacteriology* 174(24):8081-8093 (1992)), HemG (xem tài liệu: Sasarman, *et al.*, "Mapping a new hem gene in *Escherichia coli* K12" *Microbiology* 113:297-303 (1979)), và HemJ (xem tài liệu: Boynton, *et al.*, "Discovery of a gene involved in a third bacterial protoporphyrinogen oxidase activity through comparative genomic analysis and functional complementation" *Applied and Environmental Microbiology* 77(14):4795-4801 (2011)). Sáng chế đề cập đến các iPPO tái tổ hợp mới mà là các thành viên của họ HemG. Cho dù đã có hai mươi năm nghiên cứu và số lượng iPPO đã xác định được đến thời điểm này, cây trồng chuyển gen chứa iPPO tái tổ hợp vẫn chưa được thương mại hóa. Cách phòng trừ cỏ hiệu quả phụ thuộc, một phần, vào việc tiếp tục phát triển các gói tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ. Do đó, việc xác định và sử dụng các iPPO để tạo ra các tính trạng ở cây trồng chuyển gen là bước tiến trong nông nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu khác nguồn gốc liên kết theo chức năng với trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit mà có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 85% với trình tự polypeptit được chọn từ SEQ ID NO: 1 đến 20, trong đó polypeptit có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ. Theo các phương án nhất định, polypeptit có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là khoảng 85%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là khoảng 90%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 98%, hoặc mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 99% với trình tự polypeptit được chọn từ các SEQ ID NO: 1 đến 20 và có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp, trong đó trình tự axit

nucleic được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 22 đến 63. Theo các phương án cụ thể, phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự SEQ ID NO: 1 đến 20. Do đó, sáng chế đề xuất polypeptit tái tổ hợp mà có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 85% với toàn bộ chiều dài của trình tự axit amin được chọn từ các SEQ ID NO: 1 đến 20, trong đó polypeptit này có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ.

Theo các phương án nhất định, gen khởi đầu khác nguồn gốc, ví dụ, gen khởi đầu có chức năng trong tế bào thực vật, liên kết theo chức năng với trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit mà có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 85% với trình tự polypeptit theo sáng chế, ví dụ, trình tự polypeptit được chọn từ các SEQ ID NO: 1 đến 20, trong đó polypeptit này có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ. Phân tử ADN thu được như vậy có thể còn có trình tự hướng đích mà thực hiện chức năng khoanh vùng polypeptit trong tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất cấu trúc ADN chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Theo một phương án, cấu trúc ADN này chứa, trong liên kết theo chức năng với trình tự axit nucleic theo sáng chế, trình tự hướng đích mà thực hiện chức năng khoanh vùng polypeptit trong tế bào. Phân tử ADN này có thể có ở hệ gen của cây, hạt, hoặc tế bào chuyển gen. Theo các phương án nhất định, polypeptit truyền tính dung nạp thuốc diệt cỏ cho tế bào, cây, hạt, hoặc một phần của cây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế hoặc polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế. Do đó, cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen có thể có, tức là biểu hiện, tính dung nạp đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO. Theo một số phương án, cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen còn có tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ chuyển gen bổ sung.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp truyền tính dung nạp thuốc diệt cỏ cho cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây, phương pháp này bao gồm các bước: biểu hiện khác loài polypeptit tái tổ hợp theo sáng chế ở cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây. Trong phương pháp theo một số phương án, cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây có hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza được truyền bởi polypeptit tái tổ hợp. Theo một số

phương án, tính dung nạp thuốc diệt cỏ là đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO được chọn từ nhóm bao gồm acifluorfen, fomesafen, lactofen, floglycofen-ethyl, oxyfluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazone-ethyl, sulfentrazone, fluthiacet-methyl, oxadiargyl, oxadiazon, pyraflufen-ethyl, saflufenaxil và S-3100.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp biến nạp thực vật, bao gồm các bước: a) đưa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế vào tế bào thực vật; và b) tái sinh thực vật chuyển gen từ đó mà chứa phân tử ADN tái tổ hợp này. Phương pháp có thể còn bao gồm bước chọn thực vật mà dung nạp ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO. Phương pháp này còn có thể còn bao gồm bước lai chéo cây đã được tái sinh với chính nó hoặc với thực vật thứ hai và thu gom hạt từ cây lai chéo.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ ở vùng sinh trưởng của thực vật, bao gồm bước cho vùng sinh trưởng của thực vật là cây hoặc hạt chuyển gen tiếp xúc với ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO, trong đó cây hoặc hạt chuyển gen dung nạp thuốc diệt cỏ PPO này và trong đó cỏ được phòng trừ ở vùng sinh trưởng của thực vật này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định trình tự nucleotit mã hóa protein có hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza, phương pháp này bao gồm bước: a) biến nạp chủng *E. coli* có gen đã bị làm bất hoạt đối với enzym PPO tự nhiên của *E. coli* bằng vật truyền biểu hiện vi khuẩn chứa phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa protein ứng viên gây ra sự dung nạp thuốc diệt cỏ; và b) cho *E. coli* đã được biến nạp đó sinh trưởng bằng cách sử dụng môi trường vi khuẩn không chứa hem, trong đó sự sinh trưởng sử dụng môi trường vi khuẩn đó xác định protein có hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định trình tự nucleotit mã hóa protein có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ, phương pháp này bao gồm bước: a) biến nạp chủng *E. coli* có gen đã bị làm bất hoạt đối với enzym PPO tự nhiên của *E. coli* với vật truyền biểu hiện vi khuẩn chứa phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa protein tái tổ hợp; và b) cho *E. coli* đã được biến nạp đó sinh trưởng bằng cách sử dụng môi trường vi khuẩn chứa ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO, trong đó sự sinh trưởng của vi khuẩn xác định protein có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc gen dung nạp thuốc diệt cỏ bao gồm các bước: a) biểu hiện phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế ở tế bào thực vật; và b) xác định tế bào thực vật mà biểu hiện tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các phương pháp sàng lọc gen dung nạp thuốc diệt cỏ bao gồm các bước: a) biểu hiện phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế ở tế bào vi khuẩn thiếu HemG, trong đó tế bào vi khuẩn được cho sinh trưởng trong môi trường không chứa hem với sự có mặt của thuốc diệt cỏ PPO; và b) xác định tế bào vi khuẩn mà biểu hiện tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật dung nạp thuốc diệt cỏ PPO và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác bao gồm các bước: a) thu thực vật chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế; b) lai chéo thực vật chuyển gen với thực vật thứ hai có tính dung nạp đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ khác, và c) chọn thực vật thế hệ con đã được tạo ra từ bước lai chéo đó mà có tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác là khía cạnh khác của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm sự phát triển của cỏ dung nạp thuốc diệt cỏ bao gồm các bước: a) trồng trong môi trường sinh trưởng của cây trồng thực vật theo sáng chế mà có tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO, ví dụ, nhờ chứa phân tử ADN theo sáng chế, và có tính dung nạp đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ khác; và b) dùng thuốc diệt cỏ PPO và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác cho môi trường sinh trưởng của cây trồng, trong đó cây trồng này dung nạp thuốc diệt cỏ PPO đó và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác. Trong phương pháp theo các phương án nhất định, thuốc diệt cỏ PPO có thể được chọn từ nhóm bao gồm acifluorfen, fomesafen, lactofen, floglycofen-etyl, oxyfluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazone-etyl, sulfentrazone, fluthiacet-metyl, oxadiargyl, oxadiazon, pyraflufen-etyl, saflufenaxil và S-3100. Trong phương pháp theo một số phương án, ít nhất một thuốc diệt cỏ khác được chọn từ nhóm bao gồm: chất ức chế ACCaza, chất ức chế ALS, chất ức chế EPSPS, auxin tổng hợp, chất ức chế quang hợp, chất ức chế tổng hợp glutamin, chất ức chế HPPD, chất ức chế PPO, và chất ức chế axit béo mạch dài. Theo các phương án cụ thể, chất ức chế ACCaza là aryloxyphenoxy propionat hoặc xyclohexandion; chất ức chế ALS là sulfonylure, imidazolinon, triazoloyrimidin, hoặc triazolinon; chất ức chế EPSPS là glyphosat; auxin tổng hợp là thuốc diệt cỏ phenoxy, axit benzoic, axit carboxylic, hoặc semicarbazon; chất ức chế quang hợp

là triazin, triazinon, nitril, benzothiadiazol, hoặc ure; chất ức chế tổng hợp glutamin là glufosinat; chất ức chế HPPD là isoxazol, pyrazolon, hoặc triketon; chất ức chế PPO là diphenylete, N-phenylphtalimit, aryl triazinon, hoặc pyrimidindion; hoặc chất ức chế axit béo mạch dài là cloaxetamit, oxyaxetamit, hoặc pyrazol.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện các trình tự protein H_N90, H_N20, H_N60, H_N10, H_N30, H_N40, H_N50, H_N70, H_N100, và H_N110 (SEQ ID NO:1 đến 10) duỗi thẳng, với các vị trí liên ứng được thể hiện dưới đây.

Hình 2 thể hiện các kết quả thử nghiệm từ hệ sàng lọc vi khuẩn PPO bằng các thuốc diệt cỏ PPO đo được tại thời điểm 8 giờ sinh trưởng *E. coli* chứa iPPO được thử nghiệm.

Mô tả vắn tắt về các trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự axit amin của H_N90.

SEQ ID NO:2 là trình tự axit amin của H_N20.

SEQ ID NO:3 là trình tự axit amin của H_N60.

SEQ ID NO:4 là trình tự axit amin của H_N10, mà là protoporphyrinogen oxidaza HemG tự nhiên của *E. coli* (số hiệu gửi lưu tại NCBI Genbank WP_021498199).

SEQ ID NO:5 là trình tự axit amin của H_N30.

SEQ ID NO:6 là trình tự axit amin của H_N40.

SEQ ID NO:7 là trình tự axit amin của H_N50.

SEQ ID NO:8 là trình tự axit amin của H_N70.

SEQ ID NO:9 là trình tự axit amin của H_N100.

SEQ ID NO:10 là trình tự axit amin của H_N110.

SEQ ID NO:11 đến SEQ ID NO:17 là các trình tự axit amin thiếu methonin bắt đầu lần lượt tương ứng với trình tự SEQ ID NO:1, 2, 4, 5, 6, 7, và 9.

SEQ ID NO:18 và SEQ ID NO:19 là các biến thể axit amin của trình tự SEQ ID NO:11.

SEQ ID NO:20 là biến thể axit amin của trình tự SEQ ID NO:17.

SEQ ID NO:21 là trình tự axit amin của WH, mà là protoporphyrinogen oxidaza tự nhiên từ *Amaranthus tuberculatus* (cỏ gai dầu nước).

SEQ ID NO:22 đến SEQ ID NO:31 là các trình tự nucleotit lần lượt mã hóa SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10, codon đã được tối ưu hóa để biểu hiện *E. coli*.

SEQ ID NO:32 đến SEQ ID NO:41 là các trình tự nucleotit lần lượt mã hóa SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10, codon đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở cây hai lá mầm.

SEQ ID NO:42 đến SEQ ID NO:48 là các trình tự nucleotit lần lượt mã hóa SEQ ID NO:11 đến SEQ ID NO:17, codon đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở cây hai lá mầm.

SEQ ID NO:49 và SEQ ID NO:52 là các biến thể nucleotit lần lượt của trình tự SEQ ID NO:11 và SEQ ID NO:12.

SEQ ID NO: 50, 51 và 53 là các trình tự nucleotit mã hóa các trình tự SEQ ID NO:18, 19, và 20.

SEQ ID NO:54 đến SEQ ID NO:63 là các trình tự nucleotit lần lượt mã hóa SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10, codon đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở cây một lá mầm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả dưới đây và các định nghĩa được đưa ra để xác định rõ hơn sáng chế và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện sáng chế. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ cần được hiểu theo cách dùng thông thường của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp mới và các protein mà mã hóa các protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ (iPPO). Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất các vật truyền và các catxet biểu hiện mã hóa iPPO có nguồn gốc từ vi khuẩn để biểu hiện trong tế bào và thực vật. Các phương pháp tạo ra các tế bào và các thực vật dung nạp các thuốc diệt cỏ PPO cũng được đề xuất. Sáng chế còn đề xuất phương pháp và chế phẩm để áp dụng cách xử lý protein và các công cụ tin sinh học để thu được và cải thiện các iPPO.

Theo các phương án cụ thể, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp và protein. Thuật ngữ “tái tổ hợp” được dùng trong bản mô tả này để chỉ ADN, protein, tế bào, hạt, hoặc sinh vật không có trong tự nhiên mà là kết quả của việc xử lý di truyền và thường không được tìm thấy trong tự nhiên ở dạng đó. “Phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN chứa trình tự ADN mà thường không có trong tự nhiên và dạng đó là kết quả của sự can thiệp của con người, như phân tử ADN bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác nguồn gốc

với nhau. Ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN theo sáng chế mã hóa không nhạy với thuốc diệt cỏ protoporphyrinogen oxidaza liên kết theo chức năng với yếu tố điều biến khác loại hoặc yếu tố khác, như gen khởi đầu khác nguồn gốc. “Protein tái tổ hợp” là protein chứa trình tự axit amin mà không có trong tự nhiên và dạng đó là kết quả của sự can thiệp của con người, như protein đã được xử lý hoặc protein khảm. Tế bào, hạt, hoặc sinh vật tái tổ hợp là tế bào, hạt, hoặc sinh vật chứa ADN chuyển gen, ví dụ, tế bào, hạt, cây, hoặc một phần của cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp và do đó được tạo ra nhờ kết quả biến nạp thực vật.

Thuật ngữ “xử lý di truyền” được dùng trong bản mô tả này để chỉ sự tạo ra ADN, protein, hoặc sinh vật không có trong tự nhiên mà thường không được tìm thấy trong tự nhiên và do đó cần đến sự can thiệp của con người. Việc xử lý di truyền có thể được áp dụng để tạo ra ADN, protein, hoặc sinh vật đã được xử lý mà được nghĩ đến và tạo ra trong phòng thí nghiệm bằng cách áp dụng một hoặc nhiều kỹ thuật công nghệ sinh học như sinh học phân tử, hóa sinh học protein, biến nạp vi khuẩn, và biến nạp thực vật. Ví dụ, xử lý di truyền có thể được áp dụng để tạo ra gen khảm chứa ít nhất hai phân tử ADN khác nguồn gốc với nhau bằng cách áp dụng một hoặc nhiều kỹ thuật sinh học phân tử, như tách dòng gen, ghép nối ADN, và tổng hợp ADN. Gen khảm có thể chứa hai hoặc nhiều phân tử ADN khác nguồn gốc mà liên kết theo chức năng, như trình tự mã hóa protein liên kết theo chức năng với yếu tố biểu hiện gen như trình tự mã hóa peptit chuyển tiếp hoặc gen khởi đầu khác nguồn gốc. Xử lý di truyền có thể được dùng để tạo ra protein đã được xử lý mà trình tự polypeptit của nó được tạo ra bằng cách áp dụng một hoặc nhiều kỹ thuật xử lý protein, như thiết kế protein bằng cách áp dụng cách gây đột biến định hướng điểm và tiến hóa có định hướng bằng cách áp dụng đột biến ngẫu nhiên và bố trí lại ADN. Protein đã được xử lý có thể có một hoặc nhiều loại bỏ, cài xen, hoặc thay thế so với trình tự mã hóa của protein tự nhiên và mỗi loại bỏ, cài xen, hoặc thay thế có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin. Theo phương án khác, protein đã được xử lý có thể chứa hai peptit khác nguồn gốc mà liên kết theo chức năng, như enzym liên kết theo chức năng với peptit chuyển tiếp.

Thuật ngữ “không nhạy với thuốc diệt cỏ” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là khả năng của protoporphyrinogen oxidaza (PPO) duy trì ít nhất một số hoạt tính enzym của nó với sự có mặt của một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO. Hoạt tính enzym của protoporphyrinogen oxidaza có thể được đo theo cách bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật

này, ví dụ, theo thử nghiệm enzym, trong đó mức độ sản sinh sản phẩm của protoporphyrinogen oxidaza hoặc mức độ tiêu thụ cơ chất của protoporphyrinogen oxidaza với sự có mặt của một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO được đo theo mức độ phát huỳnh quang, phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC), hoặc phép đo phổ khối (MS). Ví dụ khác về thử nghiệm để đo hoạt tính enzym của protoporphyrinogen oxidaza là thử nghiệm vi khuẩn, như các thử nghiệm sinh trưởng được bộc lộ trong bản mô tả này, nhờ đó protoporphyrinogen oxidaza tái tổ hợp được biểu hiện ở tế bào vi khuẩn mà lẽ ra không có hoạt tính PPO và khả năng của protoporphyrinogen oxidaza tái tổ hợp bổ trợ kiểu hình bất hoạt gen được đo. Tính không nhạy với thuốc diệt cỏ có thể là không nhạy hoàn toàn hoặc không nhạy một phần với thuốc diệt cỏ cụ thể, và có thể được biểu hiện ở dạng mức độ dung nạp hoặc mức độ không nhạy tính theo phần trăm (%) với thuốc diệt cỏ PPO cụ thể. Các thuật ngữ “protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ” hoặc “iPPO” được dùng trong bản mô tả này thể hiện tính không nhạy với thuốc diệt cỏ với sự có mặt của một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO.

Thuật ngữ "chúng có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt" được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là sinh vật hoặc tế bào của sinh vật, như *E. coli*, mà không có hoạt tính HemG đến mức độ nó không thể sinh trưởng trong môi trường sinh trưởng không chứa hem, hoặc sao cho mức độ sinh trưởng của nó bị suy giảm một cách rõ rệt khi không chứa hem so với chủng cùng nguồn gốc khác chứa HemG chức năng. Ví dụ, chúng có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt của *E. coli* có thể được chuẩn bị theo kiến thức trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ xét theo trình tự *hemG* của *E. coli* (số hiệu gửi lưu Ecogene là EG11485; xem tài liệu: Sasarman *et al.*, "Nucleotide sequence of the *hemG* gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity *Escherichia coli* K12" *Can J Microbiol* 39:1155-1161, 1993).

Thuật ngữ “gen chuyển” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN được kết hợp theo cách không tự nhiên vào hệ gen của sinh vật do sự can thiệp của con người, như phương pháp biến nạp thực vật. Tính từ “chuyển gen” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là chứa gen chuyển, ví dụ, “thực vật chuyển gen” được dùng để chỉ thực vật chứa gen chuyển trong hệ gen của nó và “tình trạng chuyển gen” được dùng để chỉ đặc tính hoặc kiểu hình được gây ra hoặc được truyền bởi sự có mặt của gen chuyển đã được kết hợp vào hệ gen của thực vật đó. Do sự thay đổi đó ở hệ gen, thực vật chuyển gen có sự khác biệt so

với thực vật tự nhiên có liên quan và tính trạng chuyển gen là tính trạng không tìm thấy được trong tự nhiên ở thực vật tự nhiên đó. Các thực vật chuyển gen theo sáng chế chứa các phân tử ADN tái tổ hợp và các protein đã được xử lý do sáng chế đề xuất.

Thuật ngữ “khác nguồn gốc” được dùng trong bản mô tả này để chỉ mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều đối tượng thu được từ các nguồn khác nhau và do đó thường không liên quan trong tự nhiên. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa protein là khác nguồn gốc so với gen khởi đầu liên kết theo chức năng nếu tổ hợp đó thường không tìm thấy được trong tự nhiên. Ngoài ra, phân tử ADN tái tổ hợp cụ thể có thể là khác nguồn gốc so với tế bào, hạt, hoặc sinh vật mà nó được cài xen vào khi nó thường không xảy ra ở tế bào, hạt, hoặc sinh vật cụ thể đó.

Thuật ngữ “đã được phân lập” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử tách ít nhất một phần từ các phân tử khác thường liên quan với nó ở trạng thái tự nhiên của nó. Theo một phương án, thuật ngữ “đã được phân lập” được dùng để chỉ phân tử ADN mà được tách ra khỏi các axit nucleic mà thường nằm ở bên sườn của phân tử ADN ở trạng thái tự nhiên của nó. Ví dụ, phân tử ADN mã hóa protein mà trong tự nhiên có mặt trong vi khuẩn là phân tử ADN phân lập nếu nó không nằm trong ADN của vi khuẩn nơi mà phân tử ADN mã hóa protein đó được tìm thấy trong tự nhiên. Do đó, phân tử ADN được dung hợp hoặc liên kết theo chức năng với một hoặc nhiều phân tử ADN khác mà nó không được kết hợp cùng trong tự nhiên, ví dụ, nhờ các kỹ thuật ADN tái tổ hợp hoặc các kỹ thuật biến nạp thực vật, được xem là được phân lập theo sáng chế. Các phân tử này được xem là được phân lập thậm chí khi được kết hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc có mặt trong dung dịch axit nucleic với các phân tử ADN khác.

Thuật ngữ “phân tử ADN mã hóa protein” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN chứa trình tự nucleotit mà mã hóa protein. “Trình tự mã hóa protein” có nghĩa là trình tự ADN mà mã hóa protein. “Trình tự” có nghĩa là sự sắp xếp liên tục các nucleotit hoặc các axit amin. Các ranh giới của trình tự mã hóa protein có thể được xác định bởi codon bắt đầu dịch mã tại đầu tận cùng 5' và codon dừng dịch mã tại đầu tận cùng 3'. Phân tử mã hóa protein có thể chứa trình tự ADN mã hóa trình tự protein. Các thuật ngữ “sự biểu hiện gen chuyển”, “biểu hiện gen chuyển”, “sự biểu hiện protein”, và “biểu hiện protein” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là sự tạo ra protein thông qua quy trình phiên mã phân tử ADN thành ARN thông tin (mRNA) và dịch mã ARN thông tin

thành các chuỗi polypeptit, mà cuối cùng được gấp thành các protein. Phân tử ADN mã hóa protein có thể liên kết theo chức năng với gen khởi đầu khác nguồn gốc trong cấu trúc ADN để dùng trong việc biểu hiện protein trong tế bào đã được biến nạp với phân tử ADN tái tổ hợp. Thuật ngữ “liên kết theo chức năng” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hai phân tử ADN được liên kết theo cách sao cho một phân tử có thể tác động đến chức năng của phân tử còn lại. Các phân tử ADN liên kết theo chức năng có thể là một phần của một phân tử liền kề và có thể là cạnh hoặc có thể không là cạnh. Ví dụ, gen khởi đầu liên kết theo chức năng với phân tử ADN mã hóa protein trong cấu trúc ADN khi hai phân tử ADN được bố trí sao cho gen khởi đầu này có thể tác động đến sự biểu hiện của gen chuyển.

Thuật ngữ “cấu trúc ADN” được dùng trong bản mô tả này là phân tử ADN tái tổ hợp chứa hai hoặc nhiều trình tự ADN khác nguồn gốc. Các cấu trúc ADN là hữu ích đối với việc biểu hiện gen chuyển và có thể là thuộc các vật truyền và các plasmid. Các cấu trúc ADN có thể được dùng trong các vật truyền nhằm mục đích biến nạp, tức là việc đưa ADN khác nguồn gốc vào tế bào chủ, để tạo ra các thực vật và các tế bào chuyển gen, và như vậy còn có thể có trong ADN thể hạt hoặc ADN hệ gen của thực vật, hạt, tế bào, hoặc phần của thực vật chuyển gen. Thuật ngữ “vật truyền” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử ADN tái tổ hợp bất kỳ mà có thể được sử dụng nhằm mục đích biến nạp vi khuẩn hoặc biến nạp thực vật. Ví dụ, các phân tử ADN tái tổ hợp như nêu trong danh mục trình tự, có thể được cài xen vào vật truyền thành một phần của cấu trúc có phân tử ADN tái tổ hợp liên kết theo chức năng với yếu tố biểu hiện gen mà thực hiện chức năng ở thực vật để tác động đến sự biểu hiện của protein đã được xử lý được mã hóa bởi phân tử ADN tái tổ hợp. Các phương pháp chung hữu ích để xử lý các phân tử ADN nhằm tạo ra và sử dụng các cấu trúc ADN tái tổ hợp và các vật truyền biến nạp thực vật là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được bộc lộ một cách chi tiết, ví dụ, trong các sổ tay và các tài liệu hướng dẫn trong phòng thí nghiệm, kể cả tài liệu của MR Green và J Sambrook, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” (Fourth Edition) ISBN:978-1-936113-42-2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (2012). Các thành phần cho cấu trúc ADN, hoặc vật truyền chứa cấu trúc ADN, bao gồm một hoặc nhiều yếu tố biểu hiện gen liên kết theo chức năng với trình tự ADN có thể phiên mã, như sau: gen khởi đầu để biểu hiện ADN liên kết theo chức năng, phân tử ADN mã hóa protein liên kết theo chức năng, và vùng chưa được dịch mã 3’ liên kết theo chức năng (UTR). Các yếu tố biểu hiện gen hữu ích để thực

hiện sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều loại yếu tố sau: gen khởi đầu, UTR 5', gen tăng cường, gen dẫn, yếu tố hoạt động cis, intron, trình tự hướng đích, vùng dịch mã ở đầu tận cùng 3', và một hoặc nhiều gen chuyển đánh dấu chọn lọc.

Các cấu trúc ADN theo sáng chế có thể chứa gen khởi đầu liên kết theo chức năng với phân tử ADN mã hóa protein theo sáng chế, nhờ đó gen khởi đầu này dẫn quá trình biểu hiện của phân tử protein tái tổ hợp. Các gen khởi đầu hữu ích để thực hiện sáng chế bao gồm các gen khởi đầu mà thực hiện chức năng trong tế bào để biểu hiện polynucleotit liên kết theo chức năng, như gen khởi đầu của vi khuẩn hoặc của thực vật. Các gen khởi đầu của thực vật là khác nhau và đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, các gen khởi đầu mà dễ được tạo ra, của virus, tổng hợp, cơ định, được điều biến tạm thời, được điều biến trong không gian, và/hoặc được điều biến tạm thời trong không gian.

Theo một phương án của sáng chế, cấu trúc ADN theo sáng chế bao gồm trình tự hướng đích mà liên kết theo chức năng với axit nucleic khác nguồn gốc mã hóa phân tử polypeptit mà có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ, nhờ đó trình tự hướng đích tạo điều kiện thuận lợi cho việc khoanh vùng phân tử polypeptit trong tế bào này. Các trình tự hướng đích là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như các trình tự tín hiệu, các peptit hướng đích, các trình tự khoanh vùng, và các peptit chuyển tiếp. Ví dụ về trình tự hướng đích là peptit chuyển tiếp ở lục lạp (chloroplast transit peptide - CTP), trình tự hướng đích ở ty thể (mitochondrial targeting sequence - MTS), hoặc peptit hướng đích kép ở lục lạp và ty thể. Bằng cách tạo điều kiện thuận lợi cho việc khoanh vùng protein trong tế bào này, trình tự hướng đích có thể làm tăng mức độ tích tụ protein tái tổ hợp, bảo vệ protein khỏi sự thoái biến phân giải protein, và/hoặc tăng mức độ dung nạp thuốc diệt cỏ, và nhờ đó làm giảm mức độ tổn thương ở tế bào, hạt, hoặc sinh vật chuyển gen sau khi dùng thuốc diệt cỏ.

Các CTP và các phân tử hướng đích khác mà có thể được sử dụng liên quan đến sáng chế là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, EPSPS CTP của *Arabidopsis thaliana* (xem tài liệu: Klee *et al.*, *Mol Gen Genet.* 210:437-442, 1987), EPSPS CTP của *Petunia hybrida* (xem tài liệu: della-Cioppa *et al.*, *PNAS* 83:6873-6877, 1986), trình tự tín hiệu cab-m7 của cây ngô (xem tài liệu: Becker *et al.*, *Plant Mol Biol.* 20:49-60, 1992; PCT WO 97/41228), tiền trình tự của ty thể (ví dụ, xem tài liệu: Silva Filho *et al.*, *Plant Mol Biol* 30:769-780, 1996), và trình tự tín hiệu glutathion

reductaza của cây đậu Hà lan (xem tài liệu: Creissen *et al.*, *Plant J.* 8:167-175, 1995; PCT WO 97/41228).

Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể được tổng hợp và cải biến theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, hoàn toàn hoặc một phần, khi mong muốn tạo ra các trình tự hữu ích để xử lý ADN (như vị trí nhận biết enzym cắt giới hạn hoặc các vị trí tách dòng trên cơ sở tái tổ hợp), các trình tự được ưu tiên đối với thực vật (như sử dụng codon thực vật hoặc trình tự liên ứng Kozak), hoặc các trình tự hữu ích đối với thiết kế cấu trúc ADN (như phần tử đệm hoặc các trình tự liên kết). Sáng chế bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp và các protein đã được xử lý có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 70%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 80%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 85%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 90%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 96%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 97%, mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 98%, và mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 99% với phân tử ADN tái tổ hợp bất kỳ hoặc trình tự polypeptit bất kỳ theo sáng chế, và có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ. Các thuật ngữ “mức độ đồng nhất về trình tự tính theo phần trăm” hoặc “% đồng nhất về trình tự” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tỷ lệ phần trăm của các nucleotit hoặc các axit amin đồng nhất ở trình tự thẳng của polynucleotit hoặc polypeptit của trình tự tham chiếu (“ngghi ngờ”) (hoặc sợi bổ trợ của nó) so với trình tự thử nghiệm (“đối tượng”) (hoặc sợi bổ trợ của nó) nếu hai trình tự này được duỗi thẳng một cách tối ưu (với cài xen, loại bỏ, hoặc khoảng cách nucleotit hoặc axit amin thích hợp tổng ít hơn 20 phần trăm trình tự tham chiếu trên toàn bộ của sổ so sánh). Việc xếp thẳng hàng tối ưu các trình tự để so sánh của sổ so sánh là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện bằng các công cụ như thuật toán tương đồng cục bộ theo Smith và Waterman, thuật toán sắp thẳng hàng tương đồng theo Needleman và Wunsch, tra cứu phương pháp về tính tương tự theo Pearson và Lipman, và bằng cách thực hiện trên máy tính các thuật toán như GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA có sẵn là một phần của gói phần mềm phân tích trình tự GCG® Wisconsin Package® (do Accelrys Inc., San Diego, CA cung cấp), MEGAlign (do DNASTar Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715 cung cấp), và MUSCLE (phiên bản 3.6) (Edgar, “MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput” *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-7 (2004)) với các

thông số mặc định, chẳng hạn. “Tỷ lệ đồng nhất” đối với các đoạn đã được xếp thẳng hàng của trình tự thử nghiệm và trình tự tham chiếu là số lượng thành phần đồng nhất có chung ở hai trình tự đã được sắp thẳng hàng chia cho tổng số thành phần trong phần của đoạn trình tự tham chiếu được sắp thẳng hàng, tức là toàn bộ trình tự tham chiếu hoặc phần nhỏ hơn đã được xác định của trình tự tham chiếu. Mức độ đồng nhất về trình tự tính theo phần trăm được thể hiện là tỷ lệ đồng nhất nhân với 100. Việc so sánh một hoặc nhiều trình tự có thể là việc so với trình tự có chiều dài đầy đủ hoặc phần của nó, hoặc so với trình tự dài hơn.

Các protein đã được xử lý có thể được tạo ra bằng cách sửa đổi (tức là thay đổi) protein tự nhiên để tạo ra protein mới với các đặc tính đã được cải biến, ví dụ, kiểu hình khoan vùng tế bào cụ thể, như được hướng đích lặp lại hoặc ty thể, hoặc tổ hợp mới của các đặc tính hữu dụng của protein, như V_{max} , K_m , K_i , IC_{50} , tính đặc hiệu với cơ chất, tính đặc hiệu với chất ức chế/chất diệt cỏ, mức độ chọn lọc đối với cơ chất, khả năng tương tác với các thành phần khác trong tế bào như các protein đối tác hoặc các màng, và tính ổn định của protein, thay đổi trong số các đặc tính khác. Các cải biến có thể được tạo ra tại vị trí axit amin cụ thể trong protein và có thể là thay thế axit amin tìm thấy tại vị trí đó trong tự nhiên (tức là trong protein tự nhiên) bằng một axit amin khác. Do đó, các protein đã được xử lý theo sáng chế tạo ra protein mới với một hoặc nhiều đặc tính của protein thay đổi so với protein tương tự tìm thấy trong tự nhiên. Theo một phương án của sáng chế, protein đã được xử lý có các đặc tính protein thay đổi, như các đặc tính mà gây ra mức độ miễn cảm giảm đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ so với protein tương tự tự nhiên, hoặc khả năng dung nạp tốt hơn đối với thuốc diệt cỏ ở thực vật chuyển gen biểu hiện protein đã được xử lý đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ. Theo một phương án, sáng chế đề xuất protein đã được xử lý, và phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa nó, chứa ít nhất một thay thế axit amin được chọn từ Bảng 1 và có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là khoảng 70%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 80%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 85%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 90%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 95%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 96%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 97%, mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 98%, và mức độ đồng nhất về trình tự khoảng 99% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự protein đã được xử lý theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SEQ ID NO:1 đến 20. Các đột biến axit amin có thể được tạo ra ở dạng một

thay thế axit amin trong protein hoặc trong tổ hợp với một hoặc nhiều đột biến khác, như một hoặc nhiều thay thế, loại bỏ, hoặc bổ sung axit amin khác. Các đột biến có thể được tạo ra theo phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết.

Bảng 1: Các thay thế axit amin

Gốc	Các thay thế bảo toàn	Gốc	Các thay thế bảo toàn
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu; Val		

Thuật ngữ “tự nhiên” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phiên bản tương tự, nhưng không đồng nhất, với phiên bản có trong tự nhiên. Thuật ngữ “phân tử ADN tự nhiên” hoặc “protein tự nhiên” là phiên bản có trong tự nhiên của phân tử ADN hoặc protein, tức là phiên bản của phân tử ADN hoặc protein có từ trước trong tự nhiên. Ví dụ về protein tự nhiên hữu ích để so sánh với các protein đã được xử lý theo sáng chế là protoporphyrinogen oxidaza từ *Arabidopsis thaliana*. “Thực vật tự nhiên” là thực vật không chuyển gen cùng loại như thực vật chuyển gen, và ở dạng đó là khác biệt về mặt di truyền với thực vật chuyển gen có tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ. Các ví dụ về thực vật tự nhiên hữu ích để so sánh với các cây ngô chuyển gen là ngô LH244 không chuyển gen (số hiệu gửi lưu ATCC PTA-1173) và ngô lai cùng dòng 01DKD2 (I294213) (số hiệu gửi lưu ATCC PTA-7859). Đối với các cây đậu tương chuyển gen, dòng so sánh làm ví dụ sẽ là đậu tương A3555 không chuyển gen (số hiệu gửi lưu ATCC PTA-10207), và đối với các

cây bông chuyển gen, dòng so sánh làm ví dụ sẽ là Coker 130 không chuyển gen (patent Mỹ cấp cho giống cây trồng số 8900252).

Thực vật chuyển gen & thuốc diệt cỏ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào thực vật chuyển gen, mô thực vật chuyển gen, cây chuyển gen, và hạt chuyển gen mà chứa các phân tử ADN tái tổ hợp và các protein đã được xử lý theo sáng chế. Các tế bào, mô, cây, và hạt này chứa các phân tử ADN tái tổ hợp và các protein đã được xử lý thể hiện tính dung nạp thuốc diệt cỏ đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO, và tùy ý, tính dung nạp đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ khác.

Các phương pháp thích hợp để biến nạp các tế bào thực vật chủ để sử dụng theo sáng chế bao gồm hầu như mọi phương pháp mà theo đó ADN có thể được đưa vào tế bào (ví dụ, khi cấu trúc ADN tái tổ hợp được kết hợp một cách ổn định vào nhiễm sắc thể thực vật) và là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp làm ví dụ và được áp dụng rộng rãi để đưa cấu trúc ADN tái tổ hợp vào thực vật là hệ biến nạp của *Agrobacterium*, mà là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp khác làm ví dụ để đưa cấu trúc ADN tái tổ hợp vào thực vật là cài xen cấu trúc ADN tái tổ hợp vào hệ gen của thực vật tại vị trí định trước theo các phương pháp kết hợp theo định hướng điểm. Việc tích hợp định hướng điểm có thể được thực hiện theo phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng các nucleaza ngón tay kềm, đã được xử lý hoặc các meganucleaza tự nhiên, các TALE-endonucleaza, hoặc endonucleaza được dẫn bởi ARN (ví dụ hệ CRISPR/Cas9). Các thực vật chuyển gen có thể được tái tạo từ tế bào thực vật đã được biến nạp theo các phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật. Thực vật chuyển gen đồng hợp tử xét về gen chuyển (tức là hai bản sao alen của gen chuyển) có thể thu được bằng cách tự thụ phấn (tự thân) thực vật chuyển gen mà chứa một alen của gen chuyển với chính nó, ví dụ, thực vật R0, để tạo ra hạt giống R1. Một phần tư hạt giống R1 đã được tạo ra sẽ là đồng hợp tử xét về gen chuyển. Các cây sinh trưởng từ việc gieo mầm hạt R1 có thể được thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử, bằng cách áp dụng thử nghiệm SNP, xác định trình tự ADN, hoặc thử nghiệm khuếch đại bằng nhiệt mà có tính đến sự khác biệt giữa các dị hợp tử và các đồng hợp tử, gọi là thử nghiệm về tình trạng tiếp hợp giao tử.

Các thuật ngữ “chất diệt cỏ ức chế PPO” hoặc “chất diệt cỏ PPO” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là hóa chất mà hướng đích và ức chế hoạt tính enzym của protoporphyrinogen oxidaza (PPO), mà xúc tác quá trình loại hydro của protoporphyrinogen IX để tạo ra protoporphyrin IX, mà là tiền chất cho hem và diệp lục. Sự ức chế protoporphyrinogen oxidaza buộc các loại oxy phản ứng tạo ra, dẫn đến hiện tượng vỡ màng tế bào và cuối cùng làm chết các tế bào mầm cảm. Các thuốc diệt cỏ PPO là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có bán trên thị trường. Các ví dụ về thuốc diệt cỏ PPO bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các diphenylete (như acifluorfen, các muối và các este của nó, aclonifen, bifenox, các muối và các este của nó, etoxyfen, các muối và các este của nó, flonitrofen, furyloxyfen, halosafen, chlometoxyfen, floglycofen, các muối và các este của nó, lactofen, các muối và các este của nó, oxyfluorfen, và fomesafen, các muối và các este của nó); các thiadiazol (như fluthiacet-metyl và thidiazimin); pyrimidindion hoặc phenyluraxil (như benzfendizon, butafenaxil, etyl [3-2-clo-4-flo-5-(1-metyl-6-triflometyl-2,4-di-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-3-yl)phenoxy]-2-pyridyloxy]axetat (số hiệu đăng ký CAS 353292-31-6 và trong bản mô tả này được gọi là S-3100), flupropaxil, saflufenaxil, và tiafenaxil); các phenylpyrazol (như fluazolat, pyraflufen và pyraflufen-etyl); các oxadiazol (như oxadiargyl và oxadiazon); các triazolinon (như azafenidin, bencarbazon, carfentrazon, các muối và các este của nó, và sulfentrazon); các oxazolidindion (như pentoxazon); các N-phenylphtalimit (như xinidon-etyl, flumiclorac, flumiclorac-pentyl, và flumioxazin); các chất dẫn xuất của benzoxazinon (như 1,5-dimetyl-6-thioxo-3-(2,2,7-triflo-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)-1,3,5-triazinan-2,4-dion); flufenpyr và flufenpyr-etyl; pyraclonil; và profluazol. Các protoporphyrinogen oxidaza và tế bào, hạt, thực vật, và phần của thực vật theo sáng chế thể hiện tính dung nạp thuốc diệt cỏ đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO.

Các thuốc diệt cỏ có thể được phun vào vùng sinh trưởng của thực vật nơi có thực vật và hạt theo sáng chế để làm phương pháp phòng trừ cỏ. Các thực vật và các hạt theo sáng chế có tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ và do vậy chịu được một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO. Lượng dùng thuốc diệt cỏ có thể là lượng thương mại được khuyến cáo (1X) hoặc ước số hoặc bội số bất kỳ của nó, như gấp hai lần mức độ thương mại được khuyến cáo (2X). Lượng thuốc diệt cỏ có thể được biểu thị theo đương lượng axit/pao/mẫu (pao đương lượng axit/mẫu - lb ae/acre) hoặc đương lượng axit/gam/hecta (g đương lượng

axit/ha - g ae/ha) hoặc tính theo pao hoạt chất/mẫu (pao hoạt chất/mẫu - lb ai/acre) hoặc gam hoạt chất/hecta (ga hoạt chất/ha - g ai/ha), tùy thuộc vào thuốc diệt cỏ và chế phẩm. Việc dùng thuốc diệt cỏ chứa ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO. Vùng sinh trưởng của thực vật có thể hoặc không thể có cây cỏ tại thời điểm dùng thuốc diệt cỏ. Liều hữu hiệu để diệt cỏ của thuốc diệt cỏ PPO dùng trong một vùng nhằm phòng trừ cỏ có thể bao gồm khoảng từ 0,1X đến 30X mức ghi trên nhãn trong suốt mùa sinh trưởng. Lượng ghi trên nhãn 1X đối với một số thuốc diệt cỏ PPO làm ví dụ được thể hiện trong Bảng 2. Một (1) mẫu tương đương với 2,47105 hecta và một (1) pao tương đương với 453,592 gam. Lượng thuốc diệt cỏ có thể được chuyển đổi giữa hệ Anh và hệ met như sau: (pao hoạt chất/mẫu - lb ai/ac) nhân với 1,12 = (kg hoạt chất/ha - kg ai/ha) và (kg hoạt chất/ha - kg ai/ha) nhân với 0,89 = (pao hoạt chất/mẫu - lb ai/ac).

Bảng 2: Các thuốc diệt cỏ PPO làm ví dụ

Thuốc diệt cỏ PPO	Nhóm hóa chất	Lượng 1X
acifluorfen	Điphenylete	420g hoạt chất/ha
fomesafen	Điphenylete	420g hoạt chất/ha
lactofen	Điphenylete	7g đến 220g hoạt chất/ha
floglycofen-ethyl	Điphenylete	15g đến 40g hoạt chất/ha
oxyfluorfen	Điphenylete	0,28kg đến 2,24kg hoạt chất/ha
flumioxazin	N-phenylphtalimit	70g hoạt chất/ha
azafenidin	Triazolinon	240g hoạt chất/ha
carfentrazone-ethyl	Triazolinon	4g đến 36g hoạt chất/ha
sulfentrazone	Triazolinon	0,1kg đến 0,42kg hoạt chất/ha
fluthiacet-metyl	Thiadiazol	3g đến 15g hoạt chất/ha
oxadiargyl	Oxadiazol	50g đến 150g hoạt chất/ha
oxadiazon	Oxadiazol	2,24g đến 4,48kg hoạt chất/ha
pyraflufen-ethyl	Phenylpyrazol	6g đến 12g hoạt chất/ha
saflufenaxil	Pyrimidin đion	25g đến 50g/ha
S-3100	Pyrimidin đion	5g đến 80g/ha

Việc dùng thuốc diệt cỏ có thể là liên tục hoặc từng đã được trộn với một, hai, hoặc kết hợp vài thuốc diệt cỏ PPO hoặc thuốc diệt cỏ tương thích bất kỳ khác. Nhiều lần dùng

một thuốc diệt cỏ hoặc hai hoặc nhiều thuốc diệt cỏ, kết hợp hoặc đơn lẻ, có thể được áp dụng trong suốt mùa sinh trưởng cho các vùng nơi thực vật chuyển gen theo sáng chế phòng trừ phổ rộng cỏ hai lá mầm, cỏ một lá mầm, hoặc cả hai, ví dụ, hai lần dùng (như dùng trước khi trồng thực vật và dùng sau khi nhú lên hoặc dùng trước khi nhú lên và dùng sau khi nhú lên) hoặc ba lần dùng (như dùng trước khi trồng thực vật, dùng trước khi nhú lên, và dùng sau khi nhú lên hoặc dùng trước khi nhú lên và hai lần dùng sau khi nhú lên).

Các thuật ngữ “dung nạp” hoặc “dung nạp thuốc diệt cỏ” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là khả năng của thực vật, hạt, hoặc tế bào chịu được các tác dụng độc của thuốc diệt cỏ khi được dùng. Các cây trồng dung nạp thuốc diệt cỏ có thể tiếp tục sinh trưởng và không chịu tác động hoặc chịu tác động tối thiểu bởi sự có mặt của hóa chất được dùng. Thuật ngữ “tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ” được dùng trong bản mô tả này là tính trạng chuyển gen mang lại mức dung nạp thuốc diệt cỏ tốt hơn cho thực vật so với thực vật tự nhiên. Các thực vật được dự định mà lẽ ra được tạo ra với tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ theo sáng chế có thể bao gồm, ví dụ, thực vật bất kỳ kể cả các cây trồng như đậu tương (ví dụ, *Glycine max*), ngô (bắp), bông (*Gossypium sp.*), và cải dầu, trong số các thực vật khác.

Các thực vật chuyển gen, thế hệ con, hạt, tế bào thực vật, và phần của thực vật theo sáng chế còn có thể có một hoặc nhiều tính trạng bổ sung. Các tính trạng bổ sung có thể được đưa vào bằng cách lai chéo thực vật có gen chuyển chứa các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế với thực vật khác có một hoặc nhiều tính trạng bổ sung. Thuật ngữ “lai chéo” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là việc gây giống hai cá thể thực vật để tạo ra cây non. Do đó, hai thực vật có thể được lai chéo để tạo ra thế hệ con mà có các tính trạng mong muốn từ mỗi thực vật gốc. Thuật ngữ “thế hệ con” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là con của thế hệ thực vật gốc bất kỳ, và thế hệ con chuyển gen chứa cấu trúc ADN theo sáng chế và thừa kế từ ít nhất một thực vật gốc. (Các) tính trạng bổ sung còn có thể được đưa vào bằng cách đồng biến nạp cấu trúc ADN cho (các) tính trạng chuyển gen bổ sung đó với cấu trúc ADN chứa các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế (ví dụ, với tất cả các cấu trúc ADN có mặt như là một phần của cùng một vật truyền dùng để biến nạp thực vật) hoặc bằng cách cài xen (các) tính trạng bổ sung vào thực vật chuyển gen chứa cấu trúc ADN theo sáng chế hoặc ngược lại (ví dụ, bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp biến nạp thực vật hoặc hiệu chỉnh hệ gen trên thực vật chuyển

gen hoặc tế bào thực vật). Các tính trạng bổ sung này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tăng mức kháng côn trùng, tăng hiệu quả sử dụng nước, tăng năng suất, tăng khả năng chịu hạn, tăng chất lượng hạt, tăng chất lượng dinh dưỡng, sản lượng hạt lai, và tính dung nạp thuốc diệt cỏ, trong đó tính trạng này được đo so với thực vật tự nhiên. Các tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ bổ sung làm ví dụ có thể bao gồm tính dung nạp chuyển gen hoặc không chuyển gen đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ như các chất ức chế ACCaza (ví dụ, aryloxyphenoxy propionat và xyclohexandion), các chất ức chế ALS (ví dụ, sulfonylure, imidazolinon, triazoloyrimidin, và triazolinon) các chất ức chế EPSPS (ví dụ, glyphosat), các auxin tổng hợp (ví dụ, phenoxy, axit benzoic, axit carboxylic, semicarbazon), các chất ức chế quang hợp (ví dụ, triazin, triazinon, nitril, benzothiadiazol, và ure), các chất ức chế tổng hợp glutamin (ví dụ, glufosinat), các chất ức chế HPPD (ví dụ, isoxazol, pyrazolon, và triketon), các chất ức chế PPO (ví dụ, các diphenylete, N-phenylphthalimit, aryl triazinon, và pyrimidinđion), và các chất ức chế axit béo mạch dài (ví dụ, cloaxetamit, oxyaxetamit, và pyrazol), trong số các chất khác. Các tính trạng kháng côn trùng làm ví dụ có thể bao gồm tính kháng một hoặc nhiều côn trùng trong một hoặc nhiều bộ bao gồm bộ cánh vảy, bộ cánh cứng, bộ cánh nửa, và bộ cánh giông, trong số các bộ côn trùng khác. Các tính trạng bổ sung đó là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, và danh mục bao gồm các tính trạng chuyển gen này được cung cấp bởi Sở Kiểm dịch Thực vật và Động vật (Animal and Plant Health Inspection Service - APHIS) thuộc Bộ Nông nghiệp Mỹ (Department of Agriculture's - USDA).

Tế bào đã được biến nạp với polynucleotit theo sáng chế, như cấu trúc biểu hiện, có thể được chọn theo sự có mặt của polynucleotit hoặc hoạt tính enzym được mã hóa của nó trước hoặc sau khi tái sinh tế bào đó vào thực vật chuyển gen. Do vậy, các thực vật chuyển gen chứa polynucleotit này có thể đã được chọn ví dụ, bằng cách xác định thực vật chuyển gen mà chứa polynucleotit hoặc hoạt tính enzym được mã hóa, và/hoặc thể hiện tính trạng đã được biến đổi so với thực vật đối chứng lẽ ra đẳng gen. Ví dụ, tính trạng như vậy có thể là tính dung nạp thuốc diệt cỏ PPO.

Các thực vật chuyển gen và thế hệ con mà có tính trạng chuyển gen theo sáng chế có thể được dùng với các phương pháp gây giống bất kỳ mà là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ở các dòng thực vật có hai hoặc nhiều tính trạng chuyển gen, các tính trạng

chuyển gen có thể được phân biệt độc lập, liên kết, hoặc kết hợp cả hai vào các dòng thực vật có ba hoặc nhiều tính trạng chuyển gen. Việc lai chéo ngược lại với thực vật gốc và lai chéo với thực vật không chuyển gen cũng được dự định, vì là sự phát tán sinh dưỡng. Mô tả về các phương pháp gây giống mà được áp dụng cho các tính trạng và các cây trồng khác nhau là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để xác nhận sự có mặt của (các) gen chuyển ở thực vật hoặc hạt cụ thể, nhiều loại thử nghiệm có thể được thực hiện. Ví dụ, các thử nghiệm này bao gồm thử nghiệm sinh học phân tử, như thăm Nam và thăm Bắc, PCR, và xác định trình tự ADN; các thử nghiệm sinh hóa, như phát hiện sự có mặt của sản phẩm protein, ví dụ, theo các cách miễn dịch học (ELISA và phân tích vết thăm tách Tây) hoặc theo chức năng enzym; các thử nghiệm phần của thực vật, như thử nghiệm lá hoặc thử nghiệm rễ; và cả bằng cách phân tích kiểu hình của toàn bộ thực vật này.

Việc nhập gen của tính trạng chuyển gen vào kiểu di truyền thực vật đạt được là nhờ quy trình chuyển đổi lai ngược. Kiểu di truyền thực vật mà tính trạng chuyển gen được nhập gen vào có thể được gọi là kiểu hình, dòng, thể lai gần, hoặc thể lai đã được chuyển đổi lai ngược. Tương tự, kiểu di truyền thực vật không có tính trạng chuyển gen mong muốn có thể được gọi là kiểu hình, dòng, thể lai gần, hoặc thể lai không được chuyển đổi.

Vì sáng chế đã được bộc lộ một cách chi tiết, rõ ràng rằng có thể có các cải biến, các thay đổi, và các phương án tương đương mà không vượt quá phạm vi của sáng chế như được xác định trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Hơn thế nữa, cần phải hiểu rằng các ví dụ trong bản mô tả này được đưa ra làm các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để thể hiện các phương án của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu được rằng các kỹ thuật đã được bộc lộ trong các ví dụ dưới đây là các kỹ thuật do các tác giả sáng chế phát hiện để thực hiện tốt sáng chế, và do đó có thể được xem là cấu thành các cách thức thực hiện ưu tiên. Tuy nhiên, khi dựa vào bản mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng có thể tạo ra nhiều thay đổi theo các phương án cụ thể mà đã được bộc lộ và vẫn đạt được cùng một kết quả hoặc kết quả tương tự mà không vượt

quá tinh thần, ý tưởng, và phạm vi của sáng chế. Cụ thể hơn, rõ ràng rằng một số tác nhân có liên quan cả về mặt hóa học và về mặt sinh lý học có thể được thay thế cho các tác nhân đã được bộc lộ trong bản mô tả này mà đạt được cùng một kết quả hoặc kết quả tương tự. Tất cả các thay thế và các cải biến này dễ nhận thấy đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này được xem là nằm trong phạm vi, tinh thần và ý tưởng của sáng chế như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Phát hiện protoporphyrinogen oxidaza của vi khuẩn

Các protoporphyrinogen oxidaza mới được xác định từ các cơ sở dữ liệu trình tự vi khuẩn bằng cách áp dụng các phương pháp tin sinh học và hệ sàng lọc vi khuẩn protoporphyrinogen oxidaza mới. Trình tự của HemG của *E. coli* (SEQ ID NO:4) được dùng làm trình tự bắt đầu cho phân tích tin sinh học các cơ sở dữ liệu trình tự vi khuẩn. Việc phân tích sinh tin xác định ba mươi ba protoporphyrinogen oxidaza giả định mới của họ HemG PPO từ các nguồn vi khuẩn đa dạng. Các trình tự mã hóa các enzym PPO HemG giả định này được so sánh bằng cách áp dụng việc lập bản đồ cây phát sinh giống loài và được thấy là tương đối đa dạng. Mười trình tự được chọn lọc để phân tích tiếp từ nhóm gồm ba mươi ba trình tự này do cách thể hiện từng thành viên tạo cụm đặc biệt của chúng ở cây phát sinh giống loài.

Các trình tự mã hóa mười enzym PPO HemG đã được chọn đã được tối ưu hóa để biểu hiện ở *E. coli* để loại bỏ codon hiếm bất kỳ tìm thấy trong trình tự ADN tự nhiên. Sau đó, các trình tự mã hóa đã được tối ưu hóa ở *E. coli* cho mười enzym PPO HemG được tách dòng vào các vật truyền biểu hiện vi khuẩn. Enzym PPO nhạy với thuốc diệt cỏ được tìm thấy trong cỏ gai dầu nước (*Amaranthus tuberculatus*) trong tự nhiên được tách dòng vào vật truyền biểu hiện vi khuẩn để dùng làm đối chứng cho cả chức năng PPO và tính nhạy với thuốc diệt cỏ (được gọi là "WH" và được thể hiện là SEQ ID NO:21; số hiệu gửi lưu tại Genbank NCBI là ABD52326; xem tài liệu: Patzoldt, *et al.* "A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase" *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 103(33):12329-12334 (2006)). Enzym PPO của cỏ gai dầu nước không là thành viên của họ HemG. Enzym PPO HemG tìm thấy trong tự nhiên ở *E. coli* được tách dòng vào vật truyền biểu hiện vi khuẩn để dùng làm đối chứng

về cả hoạt tính PPO và để thử nghiệm nó về tính nhạy với thuốc diệt cỏ (được gọi là H_N10 và được thể hiện là SEQ ID NO:4).

Hệ sàng lọc vi khuẩn protoporphyrinogen oxidaza được tạo ra để thử nghiệm các protein tái tổ hợp về hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza và theo đó xác nhận rằng chúng là các enzym PPO chức năng. Hệ sàng lọc này đã sử dụng thử nghiệm giải thoát chức năng ở chủng *E. coli* mà chứa gen bất hoạt đối với enzym PPO của *E. coli* (SEQ ID NO:4). Chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt mà được sử dụng đã thể hiện mức độ sinh trưởng cực tiểu trên môi trường vi khuẩn không chứa hem (như môi trường LB), nhưng quá trình sinh trưởng được phục hồi khi môi trường vi khuẩn được bổ sung hem tự do hoặc khi protoporphyrinogen oxidaza tái tổ hợp có hoạt tính được biểu hiện ở *E. coli*. Do đó, chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt có thể được dùng với sự biểu hiện của protein tái tổ hợp để thử nghiệm nhanh và dễ các protein về hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza.

Chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt được biến nạp với các vật truyền biểu hiện vi khuẩn chứa gen mã hóa mười enzym PPO HemG giả định, enzym PPO HemG của *E. coli*, và enzym PPO của cỏ gai dầu nước. Tiếp đó, vi khuẩn này được cấy thành các đường sọc lên các đĩa môi trường LB, mà là môi trường vi khuẩn không chứa hem. Sự biểu hiện của enzym PPO tái tổ hợp giải thoát sự phát triển của *E. coli*, dẫn đến sự sinh trưởng trên các đĩa LB. Sự sinh trưởng của chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt đã được biến nạp trên các đĩa LB biểu thị rằng trình tự protein thực hiện chức năng như protoporphyrinogen oxidaza. Mười enzym PPO HemG (SEQ ID NO:1 đến 10), và enzym PPO của cỏ gai dầu nước (SEQ ID NO:21) có khả năng khôi phục sự sinh trưởng của chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt đã được biến nạp trong thử nghiệm này, do đó xác nhận hoạt tính PPO của chúng. Việc xếp thẳng hàng các trình tự protein của các enzym PPO, với các vị trí liên ứng, được thể hiện trên Hình 1. Bằng cách áp dụng thử nghiệm này, nhiều protein mới hoặc protein đã được xử lý có thể được sàng lọc để xác nhận và đo hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza.

Ví dụ 2: Tính kém nhạy với chất ức chế của protoporphyrinogen oxidaza

Các protoporphyrinogen oxidaza mới mà dung nạp các thuốc diệt cỏ PPO đã được xác định bằng cách sử dụng hệ sàng lọc vi khuẩn theo thuốc diệt cỏ. Hệ sàng lọc này áp dụng thử nghiệm sinh trưởng của chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt trong môi

trường lỏng LB với thuốc diệt cỏ PPO để xác định protoporphyrinogen oxidaza mà là không nhạy với thuốc diệt cỏ PPO.

Chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt được biến nạp với vật truyền biểu hiện vi khuẩn có hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza đã được xác nhận và được nuôi cấy trong môi trường lỏng LB. Dạng tinh thể tinh khiết của một trong số năm thuốc diệt cỏ PPO khác nhau (acifluorfen (1mM), flumioxazin (0,5mM), lactofen (0,5mM), fomesafen (1mM), và S-3100 (100uM), đại diện cho ba phân nhóm hóa học PPO khác nhau, được bổ sung vào môi trường này. Các protein tái tổ hợp đã được biểu hiện và tốc độ sinh trưởng của *E. coli* được đo. Đường cong sinh trưởng (OD600) đã được đo đối với các biến thể khác nhau khi có và khi không có các thuốc diệt cỏ PPO tại các thời điểm đã chọn từ thời điểm zero đến hai mươi tư giờ. Sự phát triển của chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt đã biến nạp trong môi trường LB khi có thuốc diệt cỏ PPO biểu thị rằng gen được dùng để biến nạp *E. coli* mã hóa protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ (iPPO).

Các protoporphyrinogen oxidaza mới được dùng với thử nghiệm này để thử nghiệm về tính không nhạy với các thuốc diệt cỏ PPO. Mười protoporphyrinogen oxidaza được thể hiện là SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10 đều được thấy đem lại mức độ sinh trưởng bình thường cho chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt trong môi trường LB khi có thuốc diệt cỏ PPO, biểu thị rằng các protein này là các protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ (iPPO) (Hình 2). Chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt biểu hiện PPO của cỏ gai dầu nước (SEQ ID NO:21) là nhạy với cả năm thuốc diệt cỏ PPO, đã xác nhận rằng thử nghiệm này có thể phân biệt giữa các protoporphyrinogen oxidaza nhạy và không nhạy với từng thuốc diệt cỏ. Bằng cách áp dụng thử nghiệm này, nhiều protein mới hoặc đã được xử lý có thể được sàng lọc để xác nhận hoạt tính protoporphyrinogen oxidaza khi có (các) thuốc diệt cỏ PPO.

Ví dụ 3: Thử nghiệm enzym protoporphyrinogen oxidaza (PPO)

Các protoporphyrinogen oxidaza đã được xác định tính chất nhờ enzym để đo ái lực liên kết cơ chất của mỗi enzym PPO (K_m) và mức độ nhạy với thuốc diệt cỏ PPO (IC_{50}). Các enzym PPO của thực vật tự nhiên từ cỏ gai dầu nước, đậu tương, và ngô được dùng để

so sánh với protoporphyrinogen oxidaza HemG của vi khuẩn (được thể hiện là SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10).

Nói chung, các lập thể cốm và các lập lục đã được chuẩn bị từ các lá mầm úa vàng (đậu tương, *Glyxin max*), lá/lá bao mầm úa vàng (ngô, *Zea mays*) và lá ngọn không gập (cỏ gai dầu nước, *Amaranthus tuberculata*) theo quy trình được mô tả bởi Grossmann và các đồng tác giả, (“The Herbicide Saflufenacil (Kixor™) is a New Inhibitor of Protoporphyrinogen IX Oxidase Activity” *Weed Science*, 58(1):1-9 (2010)). Hạt của cây đậu tương (A3555) và ngô (LH244) đã được đặt giữa hai tấm giấy ẩm để nảy mầm (do Anchor Paper Company, Saint Paul, Minnesota, Mỹ cung cấp) trong cốc mở chứa nước trong bóng tối liên tục trong thời gian tám đến mười ngày. Các cây cỏ gai dầu nước được cho sinh trưởng trong thời gian 30 ngày trong nhà kính. Mô được gom, được đặt giữa các tấm khăn giấy ẩm cho đến khi được nghiền thành bột mịn bằng cối giã và chày trong nitor lỏng. Dung dịch đệm đồng nhất hóa (chứa 50mM Tris-HCl, độ pH=7,4, 500mM sucroza, 1mM EDTA, 1mM magie clorua, và 2g/lit albumin huyết thanh bò) được bổ sung vào bột đã được làm đông lạnh theo tỷ lệ 4:1 (ml dung dịch đệm đồng nhất hóa/g trọng lượng mô tươi), được trộn kỹ và lọc qua bốn lớp Miracloth™ (do Merck-Millipore, Darmstadt, Germany cung cấp) đã được làm ẩm sơ bộ. Dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 9299g (92.990m/s^2) trong thời gian năm phút. Viên được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm đồng nhất hóa và được ly tâm ở tốc độ 150g (1500m/s^2) trong thời gian hai phút. Dung dịch nổi được ly tâm ở tốc độ 4000g (40.000m/s^2) trong thời gian mười lăm phút. Tất cả các bước ly tâm được thực hiện ở nhiệt độ 4°C. Viên (phân đoạn thể hạt nguyên vẹn) được tạo huyền phù lại trong dung dịch chứa 50mM Tris-HCl (độ pH=7,4), 2mM EDTA và 20% (thể tích) glyxerin và được bảo quản thành các phần phân ước ở nhiệt độ -80°C. Tổng protein trong các chế phẩm thể hạt được đo theo phương pháp Bradford (MM Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utility the principle of protein-dye binding” *Analytical Biochemistry*, 72:248-254 (1976)) với chuẩn là albumin huyết thanh bò.

Các enzym PPO đã được chọn được biểu hiện ở dòng tế bào của *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt. Các tế bào vi khuẩn từ dịch nuôi cấy qua đêm được sử dụng để gây mầm 20ml môi trường mới. Các giống cây này được để sinh trưởng trong thời gian khoảng 48 giờ ở nhiệt độ 20°C đến giống cây đặc. Các tế bào vi khuẩn được thu gom bằng cách ly

tâm và các viên tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi thực hiện các thử nghiệm enzym. Các viên vi khuẩn đông lạnh được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm chiết (50mM Tris-HCl, độ pH=7,6, 1mM EDTA & 1mM MgCl_2) và được nghiền bằng sóng âm (Sonics VibraCell™, Newtown, CT USA) trong ba chu kỳ 30 giây trong bể nước đá với giai đoạn nghỉ một phút giữa các chu kỳ này. Các tế bào vỡ được ly tâm ở tốc độ 200g (2000m/s^2) trong thời gian 2 phút ở nhiệt độ 4°C và dịch nổi được sử dụng cho các thử nghiệm enzym PPO sau khi pha loãng bằng dung dịch đệm chiết. Tổng protein được đo theo phương pháp Bradford (1976) với chuẩn là albumin huyết thanh bò.

Protoporphyrinogen IX (gen tương ứng trội) được tổng hợp bằng cách khử protoporphyrin có bán trên thị trường bằng hỗn hống natri thủy ngân như đã được bộc lộ bởi JM Jacobs và NJ Jacobs ("*Measurement of Protoporphyrinogen oxidase Activity*" trong *Current Protocols in Toxicology* (1999) 8.5.1-8.5.13, John Wiley & Sons, Inc.). Protoporphyrin (Proto) được bổ sung vào dung dịch kali hydroxit 0,01N trong etanol 20% và khuấy trong bóng tối cho đến khi được hòa tan (khoảng 40 phút). Thể tích 0,8ml được đưa vào bình polypropylen loại dung tích 2ml có nắp trên xoáy có vòng chữ O, và khoảng 1g (đỉnh bàn xẻng, dầu được dẫn tiêu nước bỏ) hỗn hống natri thủy ngân (sản phẩm số 451908, do Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri cung cấp, đã được bảo quản dưới dầu) được bổ sung vào. Ống nghiệm này được bịt nắp ngay lập tức và trộn kỹ bằng máy trộn xoáy và được thông hơi trong thời gian khoảng 30 giây một lần bằng cách nói lỏng nắp đáy cho đến khi dung dịch này không còn phát huỳnh quang màu đỏ dưới tia cực tím (UV) (khoảng năm phút). Bình phản ứng này được sục argon và được ly tâm trong một thời gian ngắn để kết viên hỗn hống natri còn lại. Dịch nổi được pha loãng ngay lập tức theo tỷ lệ 1:1 (thể tích) bằng dung dịch chứa 0,1M DTT và 0,5M Tris-HCl, độ pH=7,5 và bình này được sục argon. Dung dịch thu được được tách thành các phần phân ước nhỏ hơn vào các ống nghiệm polypropylen loại dung tích 0,5ml có đáy nắp mà được sục argon ngay sau khi phân phân ước được bổ sung vào. Các ống nghiệm đã được đầy nắp được đầy bằng lá nhôm và bảo quản ở nhiệt độ -80°C . Để thử nghiệm enzym, các phần phân ước gen tương ứng trội được cho rã băng, được bảo quản phủ trên nước đá, và sử dụng ngay trong ngày. Nồng độ của gen tương ứng trội trong chế phẩm này được tính bằng cách lấy nồng độ Proto trong nguyên liệu ban đầu trừ đi nồng độ Proto, như đo được theo sắc ký lỏng cao áp huỳnh quang (phương pháp đã được bộc lộ trong tài liệu: Matsumoto *et al*, "Porphyrin Intermediate

Involved in Herbicidal Action of delta-Aminolevulinic Acid on Duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.)” *Pesticide Biochem. and Phys.* 48:214-221 (1994)), trong dung dịch gen tương ứng trội cuối cùng (thường là khoảng 1% nguyên liệu ban đầu) và giả sử không có các tạp chất đáng kể trong mẫu này. Gen tương ứng trội được chuẩn bị và bảo quản trong các điều kiện này là ổn định trong thời gian ít nhất sáu tháng.

Hoạt tính PPO trong chiết phẩm chứa thể hạt thực vật và chiết phẩm chứa vi khuẩn thường được đo như đã được bộc lộ bởi Grossmann và các đồng tác giả (2010). Mười microlit chiết phẩm chứa thể hạt (40µg tổng protein) hoặc chiết phẩm chứa vi khuẩn (16µg đến 35µg tổng protein cho các chiết phẩm chứa vi khuẩn khác nhau) được bổ sung vào dung dịch đệm thử nghiệm (100mM Tris-HCl, độ pH=7,4, 5mM DTT, 1mM EDTA và 0,085% (thể tích) Tween 80). S-3100 (còn được gọi là "SYN-523"; ví dụ, công bố đơn đăng ký patent Mỹ số US20100062941 A1) được bổ sung vào với thể tích hai microlit từ dung dịch gốc 100X đã được điều chế trong axeton. S-3100 loại phân tích do Sumitomo Chemical Company cung cấp. Tất cả các thử nghiệm này được thực hiện ở nồng độ cuối cùng 1% (thể tích) axeton. Các chiết phẩm (chứa thể hạt hoặc vi khuẩn), dung dịch đệm, và S-3100 được ủ ở nhiệt độ 30°C (chiết phẩm chứa thực vật) hoặc nhiệt độ 37°C (chiết phẩm chứa vi khuẩn) trong thời gian năm phút trước khi bổ sung hai microlit gen tương ứng trội vào để khởi đầu thử nghiệm. Tất cả các thử nghiệm này được thực hiện trong đĩa vi chuẩn độ polystyren màu đen loại 96 lỗ (Costar® 3925, Corning, Inc., Corning, New York) ở thể tích cuối cùng 200 microlit. Sau khi bổ sung gen tương ứng trội (3µM đối với các phép đo IC₅₀; thay đổi đối với các phép đo K_m) vào tất cả các lỗ, đĩa này được ủ ở nhiệt độ 30°C (chiết phẩm chứa thực vật) hoặc nhiệt độ 37°C (chiết phẩm chứa vi khuẩn) trước khi bắt đầu thu thập dữ liệu. Mức phát huỳnh quang được đo theo thời gian ở nhiệt độ 30°C (chiết phẩm chứa thực vật) hoặc nhiệt độ 37°C (chiết phẩm chứa vi khuẩn) với bước sóng kích thích và bước sóng phát xạ lần lượt là 405nm và 630nm, trong đầu đọc vi đĩa SpectraMax® M5 Multi-Mode (do Molecular Devices, Sunnyvale, California cung cấp). Thử nghiệm rỗng được thực hiện bằng cách bổ sung chiết phẩm đã được làm bất hoạt bởi nhiệt (năm phút ở nhiệt độ 100°C) vào hỗn hợp thử nghiệm này.

Ái lực liên kết cơ chất (protoporphyrinogen) của protoporphyrinogen oxidaza đã được đo theo K_m. Các trị số K_m biểu kiến đối với mỗi PPO đã được đánh giá đã được tính bằng cách áp dụng cách khớp đường cong hypebôl vuông bằng cách sử dụng gói phần mềm

động học SoftPro® (do Molecular Devices, Sunnyvale, California cung cấp). Tính nhạy của hoạt tính enzym với thuốc diệt cỏ PPO S-3100 đã được đo theo nồng độ gây ra sự ức chế hoạt tính đối chứng ở mức 50% (IC_{50}). Các trị số IC_{50} của S-3100 đối với mỗi PPO đã được đánh giá được xác định theo đồ thị từ đồ thị bán-logarit của nồng độ của S-3100 theo hoạt tính PPO.

K_m đối với các enzym PPO từ ba nguồn thực vật (cỏ gai dầu nước, đậu tương, hoặc ngô) và các enzym PPO HemG của vi khuẩn (SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10) được thấy là tương tự, nằm trong khoảng từ 0,3uM đến 2,0uM. Ba enzym PPO thực vật đã được thử nghiệm đều nhạy với S-3100 với các trị số IC_{50} lần lượt là 0,009, 0,004, và 0,003uM. Trái lại, các enzym PPO từ nguồn vi khuẩn (SEQ ID NO: 1 đến SEQ ID NO:10) không nhạy với S-3100 với các trị số IC_{50} cao hơn 100uM. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính enzym PPO của các enzym đã được tinh chế từ nguồn thực vật hoặc nguồn vi khuẩn

Nguồn	K_m (uM)	IC_{50} của S-3100 (uM)
Cỏ gai dầu nước	0,7	0,009
Đậu tương	1,8	0,004
Ngô	2,0	0,003
H_N10 (SEQ ID NO:4)	0,7	> 100
H_N20 (SEQ ID NO:2)	0,8	> 100
H_N30 (SEQ ID NO:5)	1,0	> 100
H_N40 (SEQ ID NO:6)	1,4	> 100
H_N50 (SEQ ID NO:7)	1,0	> 100
H_N60 (SEQ ID NO:3)	1,1	> 100
H_N70 (SEQ ID NO:8)	1,4	> 100
H_N90 (SEQ ID NO:1)	1,2	> 100
H_N100 (SEQ ID NO:9)	0,6	> 100
H_N110 (SEQ ID NO:10)	0,3	> 100

Ví dụ 4: Tối ưu hóa enzym protoporphyrinogen oxidaza

Việc tối ưu hóa protein được áp dụng để cải thiện hoặc làm thay đổi các tính chất enzym của các protoporphyrinogen oxidaza mới. Một hoặc nhiều phương pháp xử lý protein đã được áp dụng để tối ưu hóa các enzym. Các ví dụ không giới hạn phạm vi của sáng chế về các phương pháp xử lý protein bao gồm đột biến quét Alanin; đột biến quét đồng đẳng; đột biến quét Pro/Gly; đổi vùng hoặc đột biến; và kết hợp các kỹ thuật khác nhau này (xem các tài liệu: M Lehmann and M Wyss, *Current Opinion in Biotechnology* 12(4):371-375 (2001); B Van den Burg and VGH Eijssink, *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):333-337 (2002); và Weiss *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97(16):8950–8954 (2000)). Các trình tự ADN mã hóa protoporphyrinogen oxidaza đã được xử lý được tổng hợp và được tách dòng vào vật truyền biểu hiện vi khuẩn. Vật truyền này được sử dụng để biến nạp chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt để sàng lọc nhằm giải thoát vi khuẩn hiệu suất cao như được mô tả trong Ví dụ 1. Protoporphyrinogen oxidaza đã được xử lý mà giải thoát chủng *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt đã được sàng lọc theo tính miễn cảm với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO bằng cách áp dụng thử nghiệm sinh trưởng vi khuẩn như được mô tả trong Ví dụ 2. Theo cách khác, chủng đã được biến nạp *E. coli* có gen *hemG* đã bị làm bất hoạt được cấy vào đĩa trên môi trường có và không có thuốc diệt cỏ PPO. Các biến thể đã được xử lý thể hiện tính dung nạp đối với các thuốc diệt cỏ PPO được biểu hiện ở hệ biểu hiện vi khuẩn và việc xác định tính chất sinh hóa chi tiết được thực hiện bằng cách sử dụng protein đã được tinh chế với thử nghiệm đo hàm lượng flo liên tục như được mô tả trong Ví dụ 3. Các biến thể đã được xử lý mà là không miễn cảm với các thuốc diệt cỏ PPO được chọn để tách dòng vào các vật truyền biến nạp thực vật, biến nạp thực vật, và thử nghiệm *in planta*.

Ví dụ 5: Biểu hiện và thử nghiệm các enzym PPO HemG ở cây ngô

Các enzym PPO HemG của vi khuẩn đã được biểu hiện ở các cây ngô chuyển gen, và các thực vật chuyển gen này được phân tích về khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ PPO. Các vật truyền biến nạp thực vật đã được tạo ra chứa phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa một enzym trong số các enzym PPO HemG của vi khuẩn thể hiện ở SEQ ID NO: 1 đến 20. Trình tự ADN mã hóa enzym PPO có thể bao gồm ở đầu tận cùng 5' codon đối với methionin, thường được gọi là codon khởi đầu, hoặc codon này có thể được loại bỏ để tạo

điều kiện thuận lợi cho liên kết theo chức năng của trình tự peptit chuyển tiếp vào đầu tận cùng 5' của trình tự mã hóa. Các ví dụ về các trình tự protein của enzym PPO chứa methionin ở đầu tận cùng amino được thể hiện ở SEQ ID NO:1 đến 10. Các ví dụ về các trình tự protein của enzym PPO không có methionin ở đầu tận cùng amino được thể hiện ở SEQ ID NO:11 đến 20. Để biến nạp thực vật, các trình tự nucleotit mã hóa các enzym PPO giả định là codon đã được tối ưu hóa đối với sự biểu hiện ở thực vật hai lá mầm hoặc một lá mầm. Bảng 4 thể hiện SEQ ID NO tương ứng với các trình tự protein và nucleotit của các enzym PPO HemG của vi khuẩn ở các vật truyền biến nạp này.

Bảng 4. SEQ ID NO tương ứng với các biến thể PPO

PPO	Protein	ADN của vi khuẩn	Codon của thực vật hai lá mầm đã được tối ưu hóa	Codon của thực vật một lá mầm đã được tối ưu hóa
H_N10	4, 13	25	35, 44	57
H_N20	2, 12	23	33, 43, 52	55
H_N30	5, 14	26	36, 45	58
H_N40	6, 15	27	37, 46	59
H_N50	7, 16	28	38, 47	60
H_N60	3	24	34	56
H_N70	8	29	39	61
H_N90	1, 11, 18, 19	22	32, 42, 49, 50, 51	54
H_N100	9, 17, 20	30	40, 48, 53	62
H_N110	10	31	41	63
PPO của cỏ gai dầu nước	21	không có	không có	không có

Bốn vật truyền biến nạp thực vật đã được tạo ra để biểu hiện PPO HemG H_N10 (SEQ ID NO:4) bằng cách sử dụng hai tổ hợp khác nhau bao gồm gen khởi đầu và trình tự dẫn và intron với hai trình tự peptit hướng đích (targeting peptide - TP) khác nhau và hai trình tự 3'UTR khác nhau. Các cấu trúc biến nạp thực vật là cấu trúc được chú thích 1, 6, 11, và 16. Đối với thử nghiệm *in planta* ở cây ngô, phôi ngô chưa thành thực (LH244) được

biến nạp với bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* và các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các cây ngô chuyển gen đã được tạo ra bằng cách sử dụng các cấu trúc biến nạp thực vật 6 và 16 chứa gen mã hóa PPO HemG H_N10 (SEQ ID NO:4). Các mẫu lá được thu gom từ các cây R0 và được sàng lọc theo PCR để xác định số lượng bản sao của gen chuyển đã được cài xen vào hệ gen của thực vật đó. Các cây có một bản sao (bản sao đơn) đã được tự phối và đã được lai chéo xa để lần lượt tạo ra hạt R1 và F1 cho các thử nghiệm tiếp theo. Các cây chứa nhiều bản sao (đa bản sao) được phun như sau: (1) 5g/ha S-3100 trong giai đoạn sinh trưởng V5, tiếp theo là 10g/ha S-3100 trong giai đoạn sinh trưởng V7, để tổng cộng sử dụng 15g/ha S-3100 hoặc (2) 10g/ha S-3100 trong giai đoạn sinh trưởng V5. Mức độ tổn thương trung bình tính theo phần trăm, trên thang tính từ 0 đến 100 với zero là không tổn thương và 100 là cây ngô chết hoàn toàn, được đánh giá 7 ngày sau bước xử lý cuối cùng đối với mỗi mẻ. Cây ngô LH244 không chuyển gen đã phun được dùng làm đối chứng và thể hiện mức độ tổn thương trung bình 43,3% khi được xử lý bằng tổng cộng 15g/ha S-3100 (Xử lý 1) và mức độ tổn thương trung bình 26,7% khi được xử lý bằng tổng cộng 10g/ha S-3100 (Xử lý 2). Các cây ngô chuyển gen biểu hiện HemG H_N10 (SEQ ID NO:4) thể hiện tốt hơn so với các cây ngô đối chứng với mức độ tổn thương trung bình 28,9% khi được xử lý bằng tổng cộng 15g/ha S-3100 (Xử lý 1) và mức độ tổn thương trung bình 24,2% khi được xử lý bằng tổng cộng 10g/ha S-3100 (Xử lý 2). Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5: Tính dung nạp thuốc diệt cỏ I của cây ngô chuyển gen

Xử lý	Protein	Cấu trúc	Cây đã được thử nghiệm	Mức độ tổn thương trung bình
1	không có	không chuyển gen	12	43,3
1	H_N10	6	18	28,9
2	không có	không chuyển gen	6	26,7
2	H_N10	16	12	24,2

Các cây ngô chuyển gen đã được tạo ra bằng cách sử dụng các cấu trúc biến nạp thực vật 6, 20, 21, 22, và 23 lần lượt chứa gen mã hóa các enzyme PPO HemG H_N90 (SEQ

ID NO:1), H_N10 (SEQ ID NO:4), H_N60 (SEQ ID NO:3), H_N110 (SEQ ID NO:10), và H_N40 (SQ ID NO:6). Năm cấu trúc này có cùng một tổ hợp gen khởi đầu và trình tự dẫn và intron, với hai trình tự peptit hướng đích (targeting peptit - TP) khác nhau, và cùng một trình tự 3'UTR. Các mẫu lá được lấy từ các cây R0 và được phân tích theo phương pháp PCR để xác định số lượng bản sao của gen chuyển. Các cây có một bản sao cho đến 12 điểm đặc biệt trong mỗi cấu trúc được cấy ghép vào chậu, được tự thụ phấn và được lai chéo xa để lần lượt tạo ra hạt R1 và F1, để thử nghiệm tiếp. Các cây nhiều bản sao và thêm các cây có một bản sao được phun 40gam/ha S-3100 trong giai đoạn sinh trưởng V5 và mức độ tổn thương được đánh giá 7 ngày sau khi xử lý. Mức độ tổn thương trung bình tính theo phần trăm (%) đối với tất cả các cây biểu hiện từng enzyme PPO và số lượng cây mà được xem là dung nạp ở mức độ cao (mức độ tổn thương thấp hơn 10%) được nhận thấy, trong đó mỗi cây là thể biến nạp có một bản sao hoặc có nhiều bản sao đặc biệt. Các cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:4) có tổng mức độ tổn thương trung bình 39,5% và tạo ra 31 cây có khả năng dung nạp cao trong số 139 cây đã được thử nghiệm. Các cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N60 (SEQ ID NO:3) có tổng mức độ tổn thương trung bình 55,8% và tạo ra 19 cây có khả năng dung nạp cao trong số 86 cây đã được thử nghiệm. Các cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N90 (SEQ ID NO:1) có tổng mức độ tổn thương trung bình thấp nhất 31,4% và tạo ra 44 cây có khả năng dung nạp cao trong số 99 cây được thử nghiệm. Các cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N40 (SEQ ID NO:6) có tổng mức độ tổn thương trung bình 47,0% và tạo ra tỷ lệ cao nhất cây có khả năng dung nạp cao với 53 cây có khả năng dung nạp cao trong số 98 cây đã được thử nghiệm. Các cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N110 (SEQ ID NO:10) có mức độ tổn thương trung bình 43,0% nhưng không tạo ra cây nào có khả năng dung nạp cao. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 6.

Bảng 6: Cây ngô chuyển gen dung nạp thuốc diệt cỏ II

Cấu trúc	Protein	SEQ ID NO	Số cây được thử nghiệm	Mức độ tổn thương trung bình	Dung nạp cao
6	H_N10	4	139	39,5%	31
20	H_N60	3	86	55,8%	19
21	H_N90	1	99	31,4%	44

22	H_N110	10	94	43,0%	0
23	H_N40	6	98	47,0%	53

Dữ liệu về cây ngô chuyển gen R0 cho thấy rằng năm enzym PPO HemG của vi khuẩn H_N90 (SEQ ID NO:1), H_N10 (SEQ ID NO:4), H_N60 (SEQ ID NO:3), H_N40 (SEQ ID NO:6), và H_N110 (SQ ID NO:10) tạo ra mức độ tổn thương giảm khi được biểu hiện ở các thực vật chuyển gen và do đó truyền cho cây trồng tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO.

Các cây chuyển gen F1 tạo ra từ việc lai chéo xa các cây R0 có một bản sao biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:4) ở một trong hai cấu hình của cấu trúc đã được thử nghiệm trong nhà kính về tính dung nạp thuốc diệt cỏ. Các cây đã được xử lý bằng 40 gam/ha S-3100 trong giai đoạn sinh trưởng V3 và đánh giá mức độ tổn thương bảy ngày sau khi xử lý. Các cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:4) ở cấu hình của cấu trúc 6 tạo ra 13 trong số 18 điểm tạo ra cây có khả năng dung nạp cao (mức độ tổn thương 10% hoặc thấp hơn) nhưng cấu hình của cấu trúc 16 không tạo ra cây nào có khả năng dung nạp cao.

Các cây chuyển gen F1 đã được tạo ra từ việc lai chéo xa các cây R0 có một bản sao biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:4) ở một trong hai cấu hình của cấu trúc (cấu trúc 6 và cấu trúc 16) đã được thử nghiệm trên cánh đồng về tính dung nạp thuốc diệt cỏ. Quần thể F1 này được phân biệt (50% bán hợp tử và 50% vô hiệu) và việc chọn lọc các thực vật chuyển gen đã không được thực hiện trước khi đánh giá mức độ tổn thương. Các mức đánh giá tổng mức độ tổn thương trung bình đối với quần thể này được kỳ vọng là cao hơn quần thể chuyển gen đồng nhất vì khó phân biệt được thực vật không chuyển gen với thực vật chuyển gen. Các thử nghiệm này đã được thực hiện tại hai địa điểm với hai lần lặp lại và 3 xử lý đối với mỗi cấu trúc. Các cây ngô không chuyển gen được dùng làm đối chứng âm tính. Việc xử lý dùng thuốc diệt cỏ là như sau: Xử lý 1 là 0,036 pao hoạt chất/mẫu (lb ai/acre) S-3100 được dùng trong giai đoạn V2, tiếp theo là (fb) V4 tiếp theo là V8; Xử lý 2: 0,072 pao hoạt chất/mẫu (lb ai/acre) S-3100 được dùng trong giai đoạn V2 tiếp theo là V4 tiếp theo là V8; Xử lý 3: 0,144 pao hoạt chất/mẫu (lb ai/acre) S-3100 được dùng trong giai đoạn V2 tiếp theo là V4 tiếp theo là V8. Mức độ tổn thương đối với cây trồng tính theo phần trăm được đánh giá trong giai đoạn sinh trưởng V2 (CIPV2) và trong giai đoạn sinh trưởng

V4 (CIPV4) vào ngày 5 đến 7 sau khi xử lý (sai số V2 và sai số V4 bằng một nửa của khác biệt đáng kể thấp nhất (least significant difference - LSD)). Các mức độ tổn thương đối với cây trồng được kết hợp đối với cả hai địa điểm. Tất cả các cây không chuyển gen và các cây có đặc điểm tạo ra do sử dụng cấu trúc 16 thể hiện mức độ tổn thương trong khoảng từ 94,6% đến 99,5% sau khi dùng thuốc diệt cỏ cả trong giai đoạn V2 và V4 đối với từng xử lý trong số ba xử lý. Các cây có đặc điểm tạo ra do sử dụng cấu trúc 6 chỉ thể hiện mức độ tổn thương trong khoảng từ 30% đến 50% sau khi dùng thuốc diệt cỏ trong giai đoạn V2 và không tổn thương sau khi dùng thuốc diệt cỏ trong giai đoạn V4. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 7.

Bảng 7. Thử nghiệm về hiệu quả trên cánh đồng đối với cây ngô F1 chứa H_N10 (SEQ ID NO:4)

Xử lý	Cấu trúc	CIPV2	CIPV4	Sai số V2	Sai số V4
Xử lý 1	dạng tự nhiên	94,6	99	8,6	1,2
	6	37,5	0	8,6	1,2
	16	96,3	98,5	8,6	1,2
Trt 2	dạng tự nhiên	99,5	99,5	5,4	0
	6	37,5	0	5,4	0
	16	99,5	99,5	5,4	0
Trt 3	dạng tự nhiên	99,5	99,5	0	0
	6	50	0	0	0
	16	99,5	99,5	0	0

Dữ liệu trong nhà kính và trên cánh đồng đối với cây ngô chuyển gen F1 đã cho thấy rằng enzym PPO HemG của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO:4) tạo ra mức độ tổn thương giảm khi được biểu hiện ở các thực vật chuyển gen và do đó truyền cho cây trồng tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO

Ví dụ 6: Biểu hiện và thử nghiệm các enzym PPO HemG ở cây đậu tương

Các enzym PPO HemG của vi khuẩn được biểu hiện ở các cây đậu tương chuyển gen, và các cây chuyển gen này được phân tích về khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ PPO. Các vật truyền biến nạp thực vật đã được tạo ra chứa phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa một

enzym trong số các enzym PPO HemG của vi khuẩn đã được thể hiện là H_N10 (SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:13); H_N20 (SEQ ID NO:12); H_N30 (SEQ ID NO:14); H_N40 (SEQ ID NO:15); H_N50 (SEQ ID NO:16); H_N90 (SEQ ID NO:11, 18, 19); và H_N100 (SEQ ID NO:17, 20).

Ở cây đậu tương, các phôi đã được cắt (A3555) đã được biến nạp với các cấu trúc biến nạp 1 và 11 bằng cách sử dụng *A. tumefaciens* và các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cấu trúc biến nạp 1 và 11 có cùng một tổ hợp gen khởi đầu và trình tự dẫn và intron, cùng một trình tự 3'UTR, cùng HemG PPO HemG của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO:4), nhưng khác nhau về các trình tự peptit hướng đích (targeting peptide - TP). Các cây non chuyển gen R0 tái sinh sinh trưởng trong nhà kính. Các cây thể hiện hai mươi đặc điểm của cây đậu tương R0 có một bản sao đã được tạo ra từ cấu trúc 11 và biểu hiện enzym PPO của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO: 4) được phun 210g/ha flumioxazin (Valor®, do Valent U.S.A. Corporation, Walnut Creek CA cung cấp). Thuốc diệt cỏ được phun trong giai đoạn phát triển V3 với ba lá của cây ba lá phát triển hoàn toàn và mức độ tổn thương được đánh giá 8 ngày sau khi xử lý. Tỷ lệ phần trăm của số cây mà được xem là dung nạp ở mức độ cao (mức độ tổn thương 15% hoặc thấp hơn) được nhận thấy. Sau khi sử dụng 210g/ha flumioxazin, các cây đậu tương đối chứng không chuyển gen có mức tổn thương trung bình 30% và không có cây có khả năng dung nạp cao. Các cây đậu tương biểu hiện enzym PPO của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO:4) có mức tổn thương trung bình 22%, và 9% số cây đã được thử nghiệm có khả năng dung nạp cao đối với thuốc diệt cỏ.

Các cây thể hiện mười đặc điểm của cây đậu tương R0 có nhiều bản sao đã được tạo ra từ cấu trúc 11 và biểu hiện enzym PPO của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO: 4) được phun 5g/ha S-3100. Thuốc diệt cỏ đã được phun trong giai đoạn phát triển V3 với ba lá của cây ba lá phát triển hoàn toàn và đánh giá mức độ tổn thương 8 ngày sau khi xử lý. Tỷ lệ phần trăm của các cây mà được xem là dung nạp ở mức độ cao (mức độ tổn thương 25% hoặc thấp hơn) được nhận thấy. Sau khi sử dụng S-3100 (5g/ha), các cây đậu tương đối chứng không chuyển gen có mức tổn thương trung bình 60% và không có cây có khả năng dung nạp cao. Các cây đậu tương biểu hiện enzym PPO của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO: 4) có mức tổn thương trung bình 47%, và 30% số cây đã được thử nghiệm có khả năng dung nạp cao đối với thuốc diệt cỏ.

Các cây đậu tương chuyển gen R1 có một bản sao trong nhà kính đã được phun một trong ba mức dùng thuốc diệt cỏ: Xử lý 1 là dùng 5 gam hoạt chất S-3100/ha trong giai đoạn V4, tiếp theo là (fb) R1; Xử lý 2 là dùng 10 gam hoạt chất S-3100/ha trong giai đoạn V4, tiếp theo là R1; Xử lý 3 là dùng 30 gam hoạt chất S-3100/ha trong giai đoạn V4, tiếp theo là R1. Mức độ tổn thương đối với cây trồng tính theo phần trăm trong giai đoạn V2 (CIPV2) được đánh giá mười ngày sau khi xử lý. Các cây không chuyển gen có mức độ tổn thương trung bình trong khoảng từ 89% đến 100% và không có mức đánh giá trong giai đoạn sinh trưởng R1. Các cây đã được tạo ra từ cấu trúc 1 và biểu hiện enzym PPO của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO: 4) có mức độ tổn thương nằm trong khoảng từ 3% đến 15,7%. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8: sàng lọc theo hiệu quả của S-3100 trong nhà kính đối với đậu tương R1

Cấu trúc	Xử lý	Nồng độ S-3100	% tổn thương trong giai đoạn V4	% tổn thương trong giai đoạn R1
1	1	5g/ha	4,2	3
1	2	10g/ha	7,8	6,5
1	3	30g/ha	9,4	15,7
không chuyển gen	1	5g/ha	89	
không chuyển gen	2	10g/ha	98	
không chuyển gen	3	30g/ha	100	

Phương pháp biến nạp thực vật và sàng lọc hiệu quả cao đã được áp dụng để đánh giá số lượng lớn cấu trúc ở các thực vật chuyển gen về khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ ở mô lá non biến nạp sớm. Phương pháp này cho phép sàng lọc nhanh hơn và nhiều hơn các cấu hình của cấu trúc và các enzym PPO.

Gen mã hóa bảy enzym PPO HemG của vi khuẩn H_N10 (SEQ ID NO:13); H_N20 (SEQ ID NO:12); H_N30 (SEQ ID NO:14); H_N40 (SEQ ID NO:15); H_N50 (SEQ ID NO:16); H_N90 (SEQ ID NO:11, 18, 19); và H_N100 (SEQ ID NO:17, 20) liên kết theo chức năng với ba mươi bảy peptit hướng đích khác nhau và đã được tách dòng vào vật truyền biến nạp thực vật nền. Cách này cho phép so sánh bảy enzym PPO HemG khác nhau với ba mươi bảy peptit hướng đích khác nhau bằng cách sử dụng cùng một gen khởi đầu và các yếu tố 3'UTR về mức độ biểu hiện gen. Các cấu trúc biến nạp thực vật này được

dùng để biến nạp các phôi đậu tương đã được cắt (chất mầm A3555) bằng cách sử dụng *A. tumefaciens* và các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bốn trăm cây đã được ủ cho mỗi cấu trúc tạo ra mười hai vật chứa cho mỗi cấu trúc. Dung dịch thuốc diệt cỏ PPO tiết trùng được sử dụng để thử nghiệm tính dung nạp thuốc diệt cỏ. Dung dịch thuốc diệt cỏ chứa 0,3g S-3100 trong dịch cô dầu của cây trồng (5,0ml) và 495ml nước đã được khử ion. Dịch này được lọc qua bộ lọc giống nuôi cấy mô Nalgene® Rapid-Flow™ cỡ 0,45 micron và bộ lọc màng xenluloza axetat không chứa chất hoạt động bề mặt (do VWR, Radnor, PA, Mỹ cung cấp). Dung dịch thu được vô trùng được lắc trước khi dùng.

Vào thời điểm năm tuần sau khi biến nạp, bốn trong số mười hai vật chứa cây cho mỗi cấu trúc được phun hai lượt dung dịch thuốc diệt cỏ PPO tiết trùng. Tiếp đó, các lá non đã được xử lý được gộp vào vật chứa này và nhận ít nhất 15 giờ phơi sáng sau khi phun mỗi ngày trong thời gian bốn ngày. Khi kết thúc ngày bốn sau khi sử dụng S-3100, các lá non đã được xử lý được chụp và được ghi trên mức nhìn thấy được của mức độ bất màu xanh (màu xanh là đại diện cho mô thực vật quang hợp lành mạnh so với mô bị tẩy trắng bởi ánh sáng) theo mức độ tổn hại. Các trị số ghi điểm là 0 cho dung nạp kém, dung nạp cao, màu xanh nhạt; 1 cho dung nạp một chút, tổn hại trung bình, mức độ bất màu xanh vừa phải; và 2 cho dung nạp tốt, tổn hại thấp, mức độ bất màu xanh cao. Điểm cho mỗi cấu trúc được thể hiện trong Bảng 9, trong đó n.d. biểu thị phân tích không được thực hiện. Kết quả này biểu thị rằng trong sàng lọc hiệu quả cao này, nhiều cấu trúc tạo ra tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO.

Bảng 9. Sàng lọc đậu tương hiệu quả cao về tính dung nạp thuốc diệt cỏ: điểm theo mức độ bất màu

Peptit hướng đích	H_10	H_N20	H_N30	H_N40	H_N50	H_N90	H_N100
TP1	n.d.	0	2	2	1	2	2
TP2	n.d.	0	0	1	1	2	1
TP3	1	1	n.d.	1	1	2	1
TP4	n.d.	1	n.d.	2	1	1	n.d.
TP5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	1	n.d.
TP6	0	1	0	n.d.	2	2	2
TP7	n.d.	2	1	2	1	2	2

TP8	0	1	1	2	1	0	0
TP9	1	1	1	0	1	1	0
TP10	n.d.	n.d.	0	n.d.	1	2	1
TP11	n.d.	1	1	1	0	2	0
TP12	1	2	1	1	1	2	2
TP13	1	2	1	1	1	2	0
TP14	0	0	n.d.	2	1	2	1
TP15	n.d.	1	1	2	2	2	2
TP16	1	1	n.d.	n.d.	0	1	1
TP17	n.d.	2	1	1	1	2	1
TP18	1	1	0	1	1	2	1
TP19	0	1	0	1	0	1	1
TP20	0	2	n.d.	n.d.	n.d.	2	2
TP21	0	0	n.d.	2	1	1	0
TP22	1	1	n.d.	n.d.	2	2	2
TP23	1	1	n.d.	1	1	1	2
TP24	0	1	1	0	1	1	0
TP25	n.d.	1	n.d.	2	2	1	1
TP26	0	1	0	1	1	0	n.d.
TP27	1	1	0	1	1	1	1
TP28	n.d.	1	0	1	1	2	1
TP29	n.d.	1	1	1	1	1	1
TP30	n.d.	1	n.d.	1	1	1	1
TP31	1	1	n.d.	1	0	0	1
TP32	n.d.	0	n.d.	1	1	0	2
TP33	1	1	1	0	1	2	1
TP34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	0
TP35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
TP36	0	n.d.	n.d.	n.d.	0	2	1
TP37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.

Các cây non trong vật chứa không được phun tương ứng với các cấu trúc có điểm 2 được cấy ghép khoảng 7 tuần sau khi biến nạp và sinh trưởng thành cây R0 bằng cách áp dụng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cây non tương ứng với các điểm không dung nạp 0 và 1 cũng được cho sinh trưởng để làm các đối chứng âm tính. Các cây R0 sinh trưởng trong nhà kính trong các điều kiện của vườn ươm ngày dài (18 giờ chiếu sáng ở nhiệt độ 80°F (26,67°C) sau đó là 6 giờ trong bóng tối ở nhiệt độ 74°F (23,33°C)) trong thời gian khoảng bốn tuần. Tại thời điểm mười một tuần, các cây R0 đã được phun hai lượt cùng một dung dịch thuốc diệt cỏ (0,3g S-3100) nêu trên. Các mức độ tổn thương do thuốc diệt cỏ gây ra được thu gom bảy ngày sau khi xử lý.

Kết quả của việc áp dụng tính dung nạp thuốc diệt cỏ tại thời điểm mười một tuần đối với các cây R0 đã xác nhận các điểm thấp về mức độ tổn thương tính theo phần trăm quan sát được trong sàng lọc hiệu quả cao tại thời điểm năm tuần. Mức độ tổn thương bất kỳ bằng 30% hoặc cao hơn là tương đương với mức độ tổn thương của cây đậu tương không chuyển gen. Một vài cấu trúc nổi bật khi tạo ra tính dung nạp tốt đối với việc dùng thuốc diệt cỏ. Ví dụ, TP1 với PPO H_N90 (SEQ ID NO:11) có mức độ tổn thương chỉ 3% và với PPO H_N30 (SEQ ID NO:14) hoặc PPO H_N40 (SEQ ID NO:15) có mức độ tổn thương chỉ 5%; TP20 với PPO H_N90 (SEQ ID NO:11) có mức độ tổn thương chỉ 5%. Trái lại, TP32 với PPO H_N90 (SEQ ID NO:11) có mức độ tổn thương 50%. Dữ liệu này được thể hiện trong Bảng 10, trong đó n.d. biểu thị khi phân tích không được thực hiện.

Bảng 10. Mức độ dung nạp thuốc diệt cỏ của cây đậu tương chuyển gen R0: điểm mức độ tổn thương tính theo phần trăm

Peptit hướng đích	H_N20	H_N30	H_N40	H_N50	H_N90	H_N100
TP1	n.d.	5	5	n.d.	3	15
TP2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
TP4	n.d.	n.d.	15	n.d.	n.d.	n.d.
TP5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP6	25	n.d.	n.d.	40	25	30
TP7	20	n.d.	40	n.d.	15	30
TP8	n.d.	n.d.	30	n.d.	40	n.d.

TP9	n.d.	35	n.d.	40	30	n.d.
TP10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
TP11	n.d.	35	n.d.	n.d.	30	n.d.
TP12	20	n.d.	n.d.	n.d.	30	50
TP13	20	n.d.	15	40	15	n.d.
TP14	n.d.	n.d.	35	40	25	n.d.
TP15	30	35	30	40	35	30
TP16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP17	25	n.d.	n.d.	40	15	n.d.
TP18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.
TP19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP20	20	n.d.	n.d.	n.d.	5	35
TP21	n.d.	n.d.	35	n.d.	25	n.d.
TP22	n.d.	n.d.	n.d.	40	30	30
TP23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
TP24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP25	n.d.	n.d.	15	35	n.d.	n.d.
TP26	n.d.	35	n.d.	n.d.	40	n.d.
TP27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	35
TP29	30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40
TP30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TP32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	50	40
TP33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25	n.d.
TP34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35	n.d.
TP35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	35
TP36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15	n.d.
TP37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Để đánh giá tiếp các cấu trúc biến nạp thực vật ở cây đậu tương, các phôi đã được cắt (A3555) đã được biến nạp bằng cách sử dụng các vật truyền biến nạp thực vật với *A. tumefaciens* và các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cây non chuyển gen R0 tái sinh đã được cho sinh trưởng trong nhà kính và được chia thành các nhóm. Các nhóm này được phun một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO mỗi nhóm để đánh giá khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ. Ví dụ, các cây chuyển gen R0 đã được phun lactofen ở nồng độ 110g hoạt chất/ha (0,09 pao hoạt chất/mẫu) hoặc 220g hoạt chất /ha (0,19 pao hoạt chất/mẫu) trong giai đoạn sinh trưởng khoảng V2 đến V4. Các cây được đánh giá về mức độ tổn thương một đến mười bốn ngày sau khi xử lý và điểm về mức độ tổn thương được ghi. Các mẫu lá được dùng để xác định các thực vật chuyển gen với một bản sao của ADN chuyển gen cài xen, và các cây R0 mà chỉ có một bản sao và qua được thử nghiệm phun thuốc diệt cỏ được tự thụ phấn để tạo ra hạt giống thế hệ R1.

Các cây R1 được cho sinh trưởng trong nhà kính và được chia thành các nhóm. Các nhóm này được phun một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO mỗi nhóm để đánh giá khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ. Ví dụ, thuốc diệt cỏ PPO lactofen được dùng trước khi nhú lên và/hoặc trong giai đoạn sinh trưởng V2 đến V6 ở nồng độ 220g hoạt chất/ha (0,19 pao hoạt chất/mẫu). Các cây đã được đánh giá về mức độ tổn thương một đến mười bốn ngày sau khi xử lý và các điểm về mức độ tổn thương được ghi. Các cây chuyển gen không được phun đã được sử dụng để so sánh kiểu hình với các cây tự nhiên không được phun.

Các cây R2 được tạo ra bằng cách tự thụ phấn cây R1 chuyển gen đồng hợp tử và thu gom hạt. Các cây R2 được đánh giá ở một hoặc nhiều địa điểm trên cánh đồng hoặc các thử nghiệm trong nhà kính. Các xử lý bằng thuốc diệt cỏ được áp dụng và các mảnh đất hoặc các cây đã được xếp hạng về tổn thương đối với cây trồng một đến mười bốn ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ ở quy mô từ 0 đến 100 với zero là không tổn thương và 100 là cây trồng chết hoàn toàn.

Ví dụ 7: Thử nghiệm đĩa lá

Thử nghiệm đĩa lá được áp dụng để đánh giá nhanh và tổn hại tối thiểu về khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ ở các thực vật chuyển gen biểu hiện enzym PPO tái tổ hợp. Mô lá đã được lấy mẫu từ lá xanh hoàn toàn non nhất của cây ngô và cây đậu tương. Năm đĩa lá có đường kính 4mm được cắt từ các mẫu lá này bằng cách sử dụng dùi sinh thiết dùng một

lần với pittông (do Integra® Miltex®, Inc., York, Pennsylvania cung cấp) và các đĩa lá này được đặt vào một ml dung dịch ủ (1mM MES, độ pH = 6,5, 1% trọng lượng/thể tích sucroza, 1% (thể tích) axeton) trong các đĩa polystyren loại 24 lỗ có nắp. Để phân tích khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ, S-3100 được bổ sung vào dung dịch ủ đến nồng độ cuối cùng 1 micromol. Quá trình thâm nhiễm chân không được áp dụng và các đĩa có đĩa lá được ủ trong bóng tối liên tục trong thời gian một ngày ở nhiệt độ trong phòng (23°C đến 24°C), tiếp theo một (đậu tương) hoặc hai (ngô) ngày ủ có ánh sáng liên tục dưới bóng đèn huỳnh quang và bóng đèn nóng sáng ở phía trên (520uE) ở nhiệt độ 26°C đến 27°C. Tiếp theo, tổn thương đối với đĩa lá được ghi nhận theo vẻ bên ngoài ở mức từ 0 (tổn thương ít nhất) đến 4 (tổn thương nhiều nhất), trong đó các điểm thấp hơn biểu thị mức độ dung nạp tốt hơn đối với thuốc diệt cỏ PPO.

Các đĩa lá của các cây ngô chuyển gen đã tạo ra được bằng cách sử dụng cấu trúc 6 và biểu hiện enzym PPO H_N10 (SEQ ID NO: 4) thể hiện khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ tốt hơn dựa trên điểm trung bình đối với đĩa lá là 0,4. Kết quả này phù hợp với mức độ dung nạp thuốc diệt cỏ PPO quan sát được ở nguyên cây đã được biến nạp với cấu trúc 6 và biểu hiện enzym PPO H_N10 (SEQ ID NO: 4). Các đĩa lá của cây đậu tương chuyển gen đã được tạo ra bằng cách sử dụng cấu trúc 1 và cấu trúc 11 và biểu hiện enzym PPO H_N10 (SEQ ID NO: 4) cho thấy rằng các cây có cấu trúc 1 có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ đáng kể với tổn thương ở mức zero, trong khi các cây có cấu trúc 11 có tổn thương ở mức 1,6 và các cây không chuyển gen có tổn thương ở mức 2,6.

Ví dụ 8: Biểu hiện và thử nghiệm các enzym PPO HemG ở cây bông

Các enzym PPO HemG của vi khuẩn được biểu hiện ở các cây bông chuyển gen, và các cây chuyển gen này được phân tích về khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ PPO. Ở cây bông, các phôi đã được cắt (Coker 130) đã được biến nạp bằng các vật truyền này bằng cách sử dụng *A. tumefaciens* và các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cây non chuyển gen R0 tái sinh đã được cho sinh trưởng trong nhà kính và được chia thành các nhóm. Các nhóm này được sử dụng để phun các thuốc diệt cỏ PPO (một thuốc diệt cỏ PPO mỗi nhóm) để đánh giá khả năng dung nạp. Ví dụ, các cây non chuyển gen R0 được phun lactofen ở nồng độ 110g hoạt chất/ha (0,09 pao hoạt chất/mẫu) hoặc 220g hoạt chất/ha (0,19 pao hoạt chất/mẫu) trong giai đoạn sinh trưởng có khoảng 2 đến 4 lá thực.

Các cây đã được đánh giá về mức độ tổn thương một đến mười bốn ngày sau khi xử lý và các điểm về mức tổn thương được ghi. Các mẫu lá đã được dùng để xác định các thực vật chuyển gen có một bản sao có cài xen chuyển gen. Các cây R0 mà chỉ có một bản sao và qua được thử nghiệm phun thuốc diệt cỏ được tự thụ phấn để tạo ra hạt giống thế hệ R1.

Các cây R1 được cho sinh trưởng trong nhà kính và được chia thành các nhóm. Các nhóm này được phun một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ PPO mỗi nhóm để đánh giá dung nạp thuốc diệt cỏ. Ví dụ, thuốc diệt cỏ PPO lactofen được dùng trước khi nhú lên và/hoặc trong giai đoạn có hai lá thực đến giai đoạn bông hoa thứ nhất ở nồng độ 220g hoạt chất/ha (0,19 pao hoạt chất/mẫu) (1X). Các cây đã được đánh giá về mức độ tổn thương một đến mười bốn ngày sau khi xử lý và các điểm về mức tổn thương được ghi. Các cây chuyển gen không được phun đã được sử dụng để so sánh kiểu hình với các cây tự nhiên không được phun.

Các cây R2 đã được tạo ra bằng cách tự thụ phấn cây R1 chuyển gen đồng hợp tử và thu gom hạt. Các cây R2 đã được đánh giá tại một hoặc nhiều địa điểm trên cánh đồng hoặc các thử nghiệm trong nhà kính. Các xử lý bằng thuốc diệt cỏ được áp dụng và các mảnh đất hoặc các cây được xếp hạng theo mức độ tổn thương đối với cây trồng một đến mười bốn ngày sau khi dùng thuốc diệt cỏ ở mức nằm trong khoảng từ 0 đến 100 với zero là không tổn thương và 100 là cây trồng chết hoàn toàn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa gen khởi đầu khác nguồn gốc liên kết theo chức năng với trình tự axit nucleic mã hóa protein mà có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95% với trình tự polypeptit SEQ ID NO:11, trong đó protein có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ, và trong đó gen khởi đầu khác nguồn gốc này có chức năng ở tế bào thực vật.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự axit nucleic bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:54, và SEQ ID NO:42.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó protein chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:18, và SEQ ID NO:11.
4. Cấu trúc ADN chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.
5. Cấu trúc ADN theo điểm 4, trong đó cấu trúc ADN có mặt trong hệ gen của cây, hạt, hoặc tế bào chuyển gen.
6. Cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.
7. Cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen theo điểm 6, trong đó cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen này có tính trạng chuyển gen dung nạp thuốc diệt cỏ bổ sung.
8. Cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen theo điểm 6, được xác định là có tính dung nạp thuốc diệt cỏ đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO.
9. Phương pháp truyền tính dung nạp thuốc diệt cỏ cho cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây, phương pháp này bao gồm bước: biểu hiện khác loài phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1 ở cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó tính dung nạp thuốc diệt cỏ là đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO được chọn từ nhóm bao gồm: acifluorfen, fomesafen, lactofen,

floglycofen-etyl, oxyfluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazone-etyl, sulfentrazone, fluthiacet-metyl, oxadiargyl, oxadiazon, pyraflufen-etyl, saflufenaxil và S-3100.

11. Phương pháp biến nạp thực vật bao gồm các bước:

- a) đưa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1 vào tế bào thực vật; và
- b) tái sinh thực vật từ tế bào thực vật mà chứa phân tử ADN tái tổ hợp này.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước chọn thực vật mà dung nạp ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO.

13. Phương pháp theo điểm 11, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước lai chéo thực vật đã được tái sinh với chính nó hoặc với thực vật thứ hai và thu gom hạt từ thực vật lai chéo.

14. Phương pháp phòng trừ cỏ ở vùng sinh trưởng của thực vật, phương pháp này bao gồm bước cho vùng sinh trưởng của thực vật chứa thực vật hoặc hạt chuyển gen theo điểm 6 tiếp xúc với ít nhất một thuốc diệt cỏ PPO, trong đó thực vật hoặc hạt chuyển gen này dung nạp thuốc diệt cỏ PPO và trong đó cỏ được phòng trừ ở vùng sinh trưởng của thực vật.

15. Phương pháp tạo ra thực vật dung nạp thuốc diệt cỏ PPO và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) thu nhận thực vật theo điểm 6; và
- b) lai chéo thực vật chuyển gen với thực vật thứ hai có tính dung nạp đối với ít nhất một thuốc diệt cỏ khác, và
- c) chọn thực vật thế hệ con tạo ra từ bước lai chéo nêu trên mà có tính dung nạp đối với thuốc diệt cỏ PPO và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác.

16. Phương pháp làm giảm sự phát triển của cỏ dung nạp thuốc diệt cỏ, phương pháp này bao gồm các bước:

- a) trồng thực vật theo điểm 7 trong môi trường sinh trưởng của cây trồng; và
- b) dùng thuốc diệt cỏ PPO và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác cho môi trường sinh trưởng của cây trồng này, trong đó cây trồng này dung nạp thuốc diệt cỏ PPO đó và ít nhất một thuốc diệt cỏ khác.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó thuốc diệt cỏ PPO được chọn từ nhóm bao gồm acifluorfen, fomesafen, lactofen, floglycofen-etyl, oxyfluorfen, flumioxazin, azafenidin, carfentrazone-etyl, sulfentrazone, fluthiacet-metyl, oxadiargyl, oxadiazon, pyraflufen-etyl, saflufenaxil và S-3100.

18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó ít nhất một thuốc diệt cỏ khác được chọn từ nhóm bao gồm: chất ức chế ACCaza, chất ức chế ALS, chất ức chế EPSPS, auxin tổng hợp, chất ức chế quang hợp, chất ức chế tổng hợp glutamin, chất ức chế HPPD, chất ức chế PPO, và chất ức chế axit béo mạch dài.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó chất ức chế ACCaza là aryloxyphenoxy propionat hoặc xyclohexandion; chất ức chế ALS là sulfonylure, imidazolinon, triazoloyrimidin, hoặc triazolinon; chất ức chế EPSPS là glyphosat; auxin tổng hợp là thuốc diệt cỏ phenoxy, axit benzoic, axit carboxylic, hoặc semicarbazon; chất ức chế quang hợp là triazin, triazinon, nitril, benzothiadiazol, hoặc ure; chất ức chế tổng hợp glutamin là glufosinat; chất ức chế HPPD là isoxazol, pyrazolon, hoặc triketon; chất ức chế PPO là diphenylete, N-phenylphthalimit, aryl triazinon, hoặc pyrimidinđion; hoặc chất ức chế axit béo mạch dài là cloaxetamit, oxyaxetamit, hoặc pyrazol.

20. Polypeptit tái tổ hợp mà có mức độ đồng nhất về trình tự ít nhất là 95% so với độ dài đầy đủ của trình tự axit amin theo SEQ ID NO:11, trong đó polypeptit này có hoạt tính của protoporphyrinogen oxidaza không nhạy với thuốc diệt cỏ.

21. Cây, hạt, tế bào, hoặc một phần của cây chuyển gen chứa polypeptit tái tổ hợp theo điểm 20.

1_PFO_H_N90	F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R	49
2_PFO_H_N20	RK...S...DVIPOQ-QQ...L...KIDASLPQWA...R	49
3_PFO_H_N60	..T...F.....RE...L...EL...LGIOA...ANVHRI.EPQWEN...R	50
4_PFO_H_N10	F.S.E...32.....NSI...E-M...F...ILRV.QIDWS...R	49
5_PFO_H_N30	VP.S...R.....NYL.GT-L...V...VINANEID.S...R	49
6_PFO_H_N40	..T...F.....K...RH...GVLE.QGWA.ELV...LOPGEFONSTVEC	50
7_PFO_H_N50	F.S...QL...S...KELEG...QA...L...NILDOTTN.ZW....R	49
8_PFO_H_N70	..T...F.....RE...AFL...EL...QGIYA...W.NAT.EIANCE...R	50
9_PFO_H_N100	..I...F.....RE...ASL...EL...QAFIV...V...HRA.NIANEE...G	50
10_PFO_H_N110		

Trình tự liên ứng ~~.....F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R~~ 50

1_PFO_H_N90	F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R	49
2_PFO_H_N20	RK...S...DVIPOQ-QQ...L...KIDASLPQWA...R	49
3_PFO_H_N60	..T...F.....RE...L...EL...LGIOA...ANVHRI.EPQWEN...R	50
4_PFO_H_N10	F.S.E...32.....NSI...E-M...F...ILRV.QIDWS...R	49
5_PFO_H_N30	VP.S...R.....NYL.GT-L...V...VINANEID.S...R	49
6_PFO_H_N40	..T...F.....K...RH...GVLE.QGWA.ELV...LOPGEFONSTVEC	50
7_PFO_H_N50	F.S...QL...S...KELEG...QA...L...NILDOTTN.ZW....R	49
8_PFO_H_N70	..T...F.....RE...AFL...EL...QGIYA...W.NAT.EIANCE...R	50
9_PFO_H_N100	..I...F.....RE...ASL...EL...QAFIV...V...HRA.NIANEE...G	50
10_PFO_H_N110		

Trình tự liên ứng ~~.....F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R~~ 100

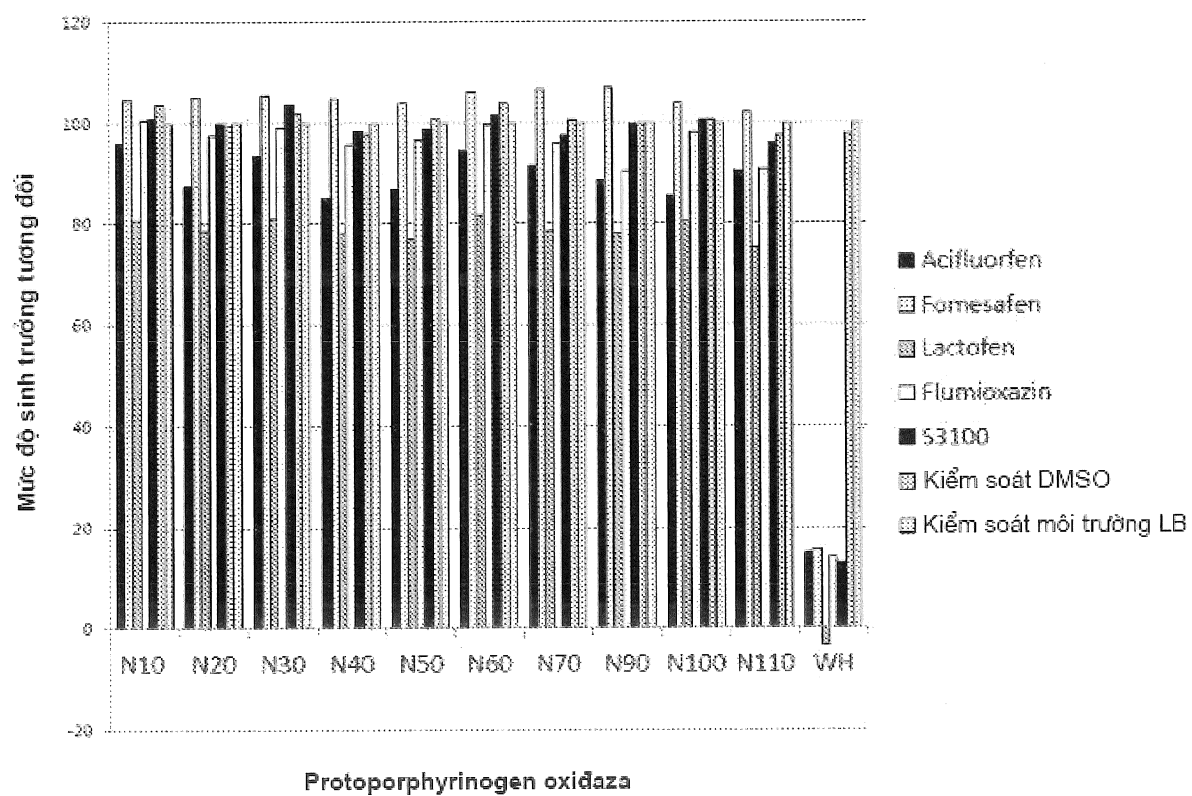
1_PFO_H_N90	F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R	149
2_PFO_H_N20	RK...S...DVIPOQ-QQ...L...KIDASLPQWA...R	149
3_PFO_H_N60	..T...F.....RE...L...EL...LGIOA...ANVHRI.EPQWEN...R	150
4_PFO_H_N10	F.S.E...32.....NSI...E-M...F...ILRV.QIDWS...R	149
5_PFO_H_N30	VP.S...R.....NYL.GT-L...V...VINANEID.S...R	149
6_PFO_H_N40	..T...F.....K...RH...GVLE.QGWA.ELV...LOPGEFONSTVEC	149
7_PFO_H_N50	F.S...QL...S...KELEG...QA...L...NILDOTTN.ZW....R	150
8_PFO_H_N70	..T...F.....RE...AFL...EL...QGIYA...W.NAT.EIANCE...R	149
9_PFO_H_N100	..I...F.....RE...ASL...EL...QAFIV...V...HRA.NIANEE...G	150
10_PFO_H_N110		

Trình tự liên ứng ~~.....F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R~~ 150

1_PFO_H_N90	DTS...EWEY...EWS...KKE...EDF...K...SY...KAL-	179
2_PFO_H_N20	.A.....Q...QR...R...Q.PG.SY--	178
3_PFO_H_N60	.ST.....Q...ST...N...Q.PG.S---	177
4_PFO_H_N10	.R...V.....AN...REI.H.ID.PT.K	181
5_PFO_H_N30	I...AR...QE...R.PG.TQ--	178
6_PFO_H_N40	.ST...I.....Q...AR...Q...Q.AA.NPA-	179
7_PFO_H_N50	.R.....QS.TR...REI.Q.PGEIR--	179
8_PFO_H_N70	.S.....Q...TR...QE...R.PG.TS--	178
9_PFO_H_N100	.R...V....S...AS...REIVQ.TASSR--	180
10_PFO_H_N110	.R...V....Q...TH...HEIVQ.VR.---	177

Trình tự liên ứng ~~.....F.....OK...A...DEI.GQ-QS...WODANTLWQ...R~~ 181

HÌNH 1



HÌNH 2

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, CẤU TRÚC ADN VÀ CÂY HOẶC MỘT PHẦN CỦA CÂY CHỨA PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP NÀY, VÀ PHƯƠNG PHÁP TRUYỀN TÍNH DUNG NẠP THUỐC DIỆT CỎ CHO CÂY HOẶC MỘT PHẦN CỦA CÂY

<130> MONS:383WO

<150> US 62/200,428

<151> 2015-08-03

<160> 63

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 179

<212> PRT

<213> Enterobacter cloacae

<400> 1

Met	Lys	Ala	Leu	Val	Leu	Tyr	Ser	Thr	Arg	Asp	Gly	Gln	Thr	His	Ala
1				5					10					15	

Ile	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ala	Ser	Cys	Met	Lys	Glu	Lys	Ala	Glu	Cys	Asp
			20					25					30		

Val	Ile	Asp	Leu	Thr	His	Gly	Glu	His	Val	Asn	Leu	Thr	Gln	Tyr	Asp
		35					40					45			

Gln	Val	Leu	Ile	Gly	Ala	Ser	Ile	Arg	Tyr	Gly	His	Phe	Asn	Ala	Val
	50					55					60				

Leu	Asp	Lys	Phe	Ile	Lys	Arg	Asn	Val	Asp	Gln	Leu	Asn	Asn	Met	Pro
65					70					75				80	

Ser	Ala	Phe	Phe	Cys	Val	Asn	Leu	Thr	Ala	Arg	Lys	Pro	Glu	Lys	Arg
				85					90					95	

Thr	Pro	Gln	Thr	Asn	Pro	Tyr	Val	Arg	Lys	Phe	Leu	Leu	Ala	Thr	Pro
		100						105					110		

Trp	Gln	Pro	Ala	Leu	Cys	Gly	Val	Phe	Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Tyr	Pro
		115					120					125			

Arg	Tyr	Arg	Trp	Ile	Asp	Lys	Val	Met	Ile	Gln	Leu	Ile	Met	Arg	Met
	130					135					140				

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Glu Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu Ser Tyr Lys
 165 170 175

Lys Ala Leu

<210> 2
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

<400> 2

Met Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Gln Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Ala Ile Ala Asp Glu Ile Lys Gly Gln Gln Ser Cys Asp
 20 25 30

Val Ile Asn Ile Gln Asp Ala Lys Thr Leu Asp Trp Gln Gln Tyr Asp
 35 40 45

Arg Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Gln Pro Val
 50 55 60

Val Asn Glu Phe Val Lys His Asn Leu Leu Ala Leu Gln Gln Arg Val
 65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Ser Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Val Lys Phe Leu Ala Gln Ser Pro
 100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Tyr Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Phe Ile Met Arg Met
 130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ala Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Gln Gln Val Gln Arg Phe Ala Arg Asp Phe Ala Gln Leu Pro Gly Lys

165

170

175

Ser Tyr

<210> 3
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Pantoea stewardii

<400> 3

Met Lys Ala Leu Ile Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Ser Ile Ala Asp Val Ile Arg Gln Gln Gln Gln Cys Asp
 20 25 30

Val Leu Asn Ile Lys Asp Ala Ser Leu Pro Asp Trp Ala Gln Tyr Asp
 35 40 45

Arg Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Gln Pro Val
 50 55 60

Val Asp Lys Phe Val Lys Gln His Leu His Glu Leu Gln Gln Arg Thr
 65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Ser Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Phe Leu Ala His Ser Pro
 100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Tyr Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
 130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ser Thr Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Gln Gln Val Ser Thr Phe Ala Asn Asp Phe Ala Gln Leu Pro Gly Lys
 165 170 175

Ser

<210> 4
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 4

Met Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Leu Gly Ile Gln Ala
 20 25 30

Asp Val Ala Asn Val His Arg Ile Glu Glu Pro Gln Trp Glu Asn Tyr
 35 40 45

Asp Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Tyr His Ser
 50 55 60

Ala Phe Gln Glu Phe Val Lys Lys His Ala Thr Arg Leu Asn Ser Met
 65 70 75 80

Pro Ser Ala Phe Tyr Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys
 85 90 95

Arg Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Ala Arg Lys Phe Leu Met Asn Ser
 100 105 110

Gln Trp Arg Pro Asp Arg Cys Ala Val Ile Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
 115 120 125

Pro Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Lys Leu Ile Met Lys
 130 135 140

Met Ser Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp
 145 150 155 160

Trp Glu Gln Val Ala Asn Phe Ala Arg Glu Ile Ala His Leu Thr Asp
 165 170 175

Lys Pro Thr Leu Lys
 180

<210> 5
 <211> 178
 <212> PRT

<213> Erwinia toletana

<400> 5

Met Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Ser Arg Glu Gly Gln Thr Arg Glu
1 5 10 15

Ile Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Cys Asp
20 25 30

Val Phe Asn Ile Leu Arg Val Glu Gln Ile Asp Trp Ser Gln Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Leu Ile Gly Gly Ser Ile His Tyr Gly His Phe His Pro Ala
50 55 60

Val Ala Lys Phe Val Lys Arg His Leu His Glu Leu Gln Gln Arg Ser
65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Ala Asp Lys Arg
85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ala Tyr Met Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Pro
100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Thr
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Thr Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Glu Phe Ala His Leu Pro Gly Lys
165 170 175

Thr Gln

<210> 6

<211> 179

<212> PRT

<213> Pectobacterium carotovorum

<400> 6

Met Lys Ala Leu Ile Val Phe Ser Ser Arg Asp Gly Gln Thr Arg Ala

```

1              5              10              15

Ile Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Thr Leu Lys Gly Thr Leu Glu Cys Asp
      20              25              30

Val Val Asn Val Leu Asn Ala Asn Asp Ile Asp Leu Ser Gln Tyr Asp
      35              40              45

Arg Val Ala Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly Arg Phe His Pro Ala
      50              55              60

Val Asn Gln Phe Ile Arg Lys His Leu Thr Ser Leu Gln Gln Leu Pro
      65              70              75              80

Ser Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
      85              90              95

Thr Ile Gln Thr Asn Ala Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro
      100              105              110

Trp Gln Pro Asp Leu Cys Cys Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
      115              120              125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Ile
      130              135              140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ser Thr Lys Glu Ile Glu Tyr Thr Asp Trp
      145              150              155              160

Gln Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Asp Phe Ala Gln Leu Ala Ala Lys
      165              170              175

Asn Pro Ala

<210>  7
<211> 179
<212> PRT
<213> Shimwellia blattae

<400>  7

Met Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Lys
1              5              10              15

Ile Ala Arg His Ile Ala Gly Val Leu Glu Glu Gln Gly Lys Ala Cys
      20              25              30

```

Glu Leu Val Asp Leu Leu Gln Pro Gly Glu Pro Asp Trp Ser Thr Val
 35 40 45

Glu Cys Val Val Leu Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Lys
 50 55 60

Ser Phe Ile Arg Phe Val Asn Thr His Ala Gln Arg Leu Asn Asn Met
 65 70 75 80

Pro Gly Ala Leu Phe Thr Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys
 85 90 95

Gln Ser Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Pro Trp Gln Pro Gln Arg Cys Gln Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
 115 120 125

Pro Arg Tyr Ser Trp Tyr Asp Arg Met Met Ile Arg Leu Ile Met Lys
 130 135 140

Met Ala Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp
 145 150 155 160

Trp Gln Ser Val Thr Arg Phe Ala Arg Glu Ile Ala Gln Leu Pro Gly
 165 170 175

Glu Thr Arg

<210> 8
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Pantoea stewardii

<400> 8

Met Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Ser Arg Asp Gly Gln Thr Gln Leu
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Ser Ile Ala Lys Glu Leu Glu Gly Lys Gln Ala Cys Asp
 20 25 30

Val Leu Asn Ile Leu Asp Thr Thr Asn Val Glu Trp Thr Gln Tyr Asp
 35 40 45

Arg Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro Ala
 50 55 60

Val Ala Glu Phe Val Lys Arg His Gln Arg Glu Leu Gln Gln Arg Ser
 65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Ser Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Ala Lys Phe Leu Asn Gln Ser Pro
 100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Ile Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
 130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ser Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Gln Gln Val Thr Arg Phe Ala Gln Glu Phe Ala Arg Leu Pro Gly Lys
 165 170 175

Thr Ser

<210> 9
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Enterobacter cloacae

<400> 9

Met Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Gly Ile Tyr Ala
 20 25 30

Asp Val Ile Asn Leu Asn Arg Thr Glu Glu Ile Ala Trp Gln Glu Tyr
 35 40 45

Asp Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro
 50 55 60

Ala Val Asp Arg Phe Val Lys Lys His Thr Glu Thr Leu Asn Ser Leu
65 70 75 80

Pro Gly Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Ala Glu Lys
85 90 95

Arg Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser
100 105 110

Pro Trp Lys Pro Ala Ala Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
115 120 125

Pro Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Arg Leu Ile Met Lys
130 135 140

Met Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp
145 150 155 160

Trp Ser Gln Val Ala Ser Phe Ala Arg Glu Ile Val Gln Leu Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Arg Leu
180

<210> 10
<211> 177
<212> PRT
<213> Enterobacter mori

<400> 10

Met Lys Ile Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu
1 5 10 15

Ile Ala Ala Ser Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Ala Phe Asp Val
20 25 30

Asp Val Val Asn Leu His Arg Ala Glu Asn Ile Ala Trp Glu Glu Tyr
35 40 45

Asp Gly Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Ser
50 55 60

Thr Leu Asn Ser Phe Val Lys Lys His Gln Gln Ala Leu Lys Lys Leu
65 70 75 80

Pro Gly Ala Phe Tyr Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys

85 90 95
 Arg Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asp Ser
 100 105 110
 Pro Trp Gln Pro Asp Leu Ser Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
 115 120 125
 Pro Arg Tyr Asn Trp Tyr Asp Arg Ile Met Ile Arg Leu Ile Met Lys
 130 135 140
 Ile Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp
 145 150 155 160
 Trp Gln Gln Val Thr His Phe Ala His Glu Ile Val Gln Leu Val Arg
 165 170 175
 Lys
 <210> 11
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Enterobacter cloacae
 <400> 11
 Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala Ile
 1 5 10 15
 Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp Val
 20 25 30
 Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Gln
 35 40 45
 Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val Leu
 50 55 60
 Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro Ser
 65 70 75 80
 Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
 85 90 95
 Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro Trp
 100 105 110

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

Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Glu
 145 150 155 160

Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu Ser Tyr Lys Lys
 165 170 175

Ala Leu

<210> 12
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

<400> 12

Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Gln Lys Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ile Ala Asp Glu Ile Lys Gly Gln Gln Ser Cys Asp Val
 20 25 30

Ile Asn Ile Gln Asp Ala Lys Thr Leu Asp Trp Gln Gln Tyr Asp Arg
 35 40 45

Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Gln Pro Val Val
 50 55 60

Asn Glu Phe Val Lys His Asn Leu Leu Ala Leu Gln Gln Arg Val Ser
 65 70 75 80

Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Ser
 85 90 95

Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Val Lys Phe Leu Ala Gln Ser Pro Trp
 100 105 110

Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Tyr Tyr Pro Arg
 115 120 125

Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Phe Ile Met Arg Met Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Ala Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Gln
 145 150 155 160

Gln Val Gln Arg Phe Ala Arg Asp Phe Ala Gln Leu Pro Gly Lys Ser
 165 170 175

Tyr

<210> 13
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 13

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Leu Gly Ile Gln Ala Asp
 20 25 30

Val Ala Asn Val His Arg Ile Glu Glu Pro Gln Trp Glu Asn Tyr Asp
 35 40 45

Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Tyr His Ser Ala
 50 55 60

Phe Gln Glu Phe Val Lys Lys His Ala Thr Arg Leu Asn Ser Met Pro
 65 70 75 80

Ser Ala Phe Tyr Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Ala Arg Lys Phe Leu Met Asn Ser Gln
 100 105 110

Trp Arg Pro Asp Arg Cys Ala Val Ile Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Lys Leu Ile Met Lys Met
 130 135 140

Ser Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Glu Gln Val Ala Asn Phe Ala Arg Glu Ile Ala His Leu Thr Asp Lys
 165 170 175

Pro Thr Leu Lys
 180

<210> 14
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Erwinia toletana

<400> 14

Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Ser Arg Glu Gly Gln Thr Arg Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Cys Asp Val
 20 25 30

Phe Asn Ile Leu Arg Val Glu Gln Ile Asp Trp Ser Gln Tyr Asp Arg
 35 40 45

Val Leu Ile Gly Gly Ser Ile His Tyr Gly His Phe His Pro Ala Val
 50 55 60

Ala Lys Phe Val Lys Arg His Leu His Glu Leu Gln Gln Arg Ser Ser
 65 70 75 80

Gly Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Ala Asp Lys Arg Thr
 85 90 95

Pro Gln Thr Asn Ala Tyr Met Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Pro Trp
 100 105 110

Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Thr Arg
 115 120 125

Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Thr
 145 150 155 160

Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Glu Phe Ala His Leu Pro Gly Lys Thr

165

170

175

Gln

<210> 15
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Pectobacterium carotovorum

<400> 15

Lys Ala Leu Ile Val Phe Ser Ser Arg Asp Gly Gln Thr Arg Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Thr Leu Lys Gly Thr Leu Glu Cys Asp Val
 20 25 30

Val Asn Val Leu Asn Ala Asn Asp Ile Asp Leu Ser Gln Tyr Asp Arg
 35 40 45

Val Ala Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly Arg Phe His Pro Ala Val
 50 55 60

Asn Gln Phe Ile Arg Lys His Leu Thr Ser Leu Gln Gln Leu Pro Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
 85 90 95

Ile Gln Thr Asn Ala Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro Trp
 100 105 110

Gln Pro Asp Leu Cys Cys Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro Arg
 115 120 125

Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Ile Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Ser Thr Lys Glu Ile Glu Tyr Thr Asp Trp Gln
 145 150 155 160

Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Asp Phe Ala Gln Leu Ala Ala Lys Asn
 165 170 175

Pro Ala

<210> 16
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Shimwellia blattae

<400> 16

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Lys Ile
 1 5 10 15

Ala Arg His Ile Ala Gly Val Leu Glu Glu Gln Gly Lys Ala Cys Glu
 20 25 30

Leu Val Asp Leu Leu Gln Pro Gly Glu Pro Asp Trp Ser Thr Val Glu
 35 40 45

Cys Val Val Leu Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Lys Ser
 50 55 60

Phe Ile Arg Phe Val Asn Thr His Ala Gln Arg Leu Asn Asn Met Pro
 65 70 75 80

Gly Ala Leu Phe Thr Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys Gln
 85 90 95

Ser Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Ala Ala Ser Pro
 100 105 110

Trp Gln Pro Gln Arg Cys Gln Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Ser Trp Tyr Asp Arg Met Met Ile Arg Leu Ile Met Lys Met
 130 135 140

Ala Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Gln Ser Val Thr Arg Phe Ala Arg Glu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu
 165 170 175

Thr Arg

<210> 17
 <211> 179
 <212> PRT

<213> Enterobacter cloacae

<400> 17

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu Ile
1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Gly Ile Tyr Ala Asp
20 25 30

Val Ile Asn Leu Asn Arg Thr Glu Glu Ile Ala Trp Gln Glu Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro Ala
50 55 60

Val Asp Arg Phe Val Lys Lys His Thr Glu Thr Leu Asn Ser Leu Pro
65 70 75 80

Gly Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Ala Glu Lys Arg
85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro
100 105 110

Trp Lys Pro Ala Ala Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Arg Leu Ile Met Lys Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Ser Gln Val Ala Ser Phe Ala Arg Glu Ile Val Gln Leu Thr Arg Ser
165 170 175

Ser Arg Leu

<210> 18

<211> 178

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 18

Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp Val
 20 25 30

Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Gln
 35 40 45

Val Leu Ile Gly Ala Asn Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val Leu
 50 55 60

Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
 85 90 95

Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro Trp
 100 105 110

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

Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Glu
 145 150 155 160

Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu Ser Tyr Lys Lys
 165 170 175

Ala Leu

<210> 19

<211> 172

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 19

Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp Val
 20 25 30

Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Gln
 35 40 45

Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val Leu
 50 55 60

Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
 85 90 95

Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro Trp
 100 105 110

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

Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Glu
 145 150 155 160

Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu
 165 170

<210> 20
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 20

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Gly Ile Tyr Ala Asp
 20 25 30

Val Ile Asn Leu Asn Arg Thr Glu Glu Ile Ala Trp Gln Glu Tyr Asp
 35 40 45

Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro Ala
 50 55 60

Val Asp Arg Phe Val Lys Lys His Thr Glu Thr Leu Asn Ser Leu Pro
 65 70 75 80

Gly Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Ala Glu Lys Arg
 85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro
 100 105 110

Trp Lys Pro Ala Ala Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Arg Leu Ile Met Lys Met
 130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Ser Gln Ile Ala Ser Phe Ala Arg Glu Ile Val Gln Leu Thr Arg Ser
 165 170 175

Ser Arg Leu

<210> 21
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Amaranthus tuberculatus

<400> 21

Met Gly Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val
 1 5 10 15

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
 20 25 30

Lys Ser His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala
 35 40 45

Gly Gly Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu
 50 55 60

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile
 65 70 75 80

Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn
 85 90 95

Lys Arg Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn
 100 105 110

Pro Ala Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu
 115 120 125

Gln Ile Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu
 130 135 140

Leu Ser Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg
 145 150 155 160

His Phe Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala
 165 170 175

Gly Thr Cys Gly Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe
 180 185 190

Pro Glu Val Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly
 195 200 205

Leu Ile Gln Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Asn
 210 215 220

Ala Ser Ile Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly
 225 230 235 240

Gly Met Gln Thr Leu Val Asp Thr Met Cys Lys Gln Leu Gly Glu Asp
 245 250 255

Glu Leu Lys Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Lys
 260 265 270

Gly Ile Pro Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Asn
 275 280 285

Thr Ser Glu Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile
 290 295 300

Arg Asn Val Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe Ser
 305 310 315 320

Leu Asp Phe Ile Pro Glu Val Thr Tyr Val Pro Leu Ser Val Met Ile
 325 330 335

Thr Ala Phe Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly
 340 345 350

Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly
 355 360 365

Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met
 370 375 380

Cys Leu Phe Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala
 385 390 395 400

Asn Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln
 405 410 415

Gln Leu Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe
 420 425 430

Trp Ser Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu
 435 440 445

Arg Ala Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala
 450 455 460

Gly Asn His Lys Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ala Met Ala Ser Gly
 465 470 475 480

Cys Lys Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr
 485 490 495

Val Lys Met Asp Glu Lys Thr Ala
 500

<210> 22
 <211> 537
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 22

atgaaaagcgc tgggtgctgta tagcaccgcg gatggccaga cccatgcatg tgcgagctat	60
attgcgagct gcatgaaaga aaaagcggaa tgcgatgtga ttgatctgac ccatggcgaa	120
catgtgaacc tgaccagta tgatcaggtg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat	180
tttaacgcgg tgctggataa atttattaaa cgcaacgtgg atcagctgaa caacatgccg	240
agcgcttttt tttgcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcac cccgcagacc	300
aaccgctatg tgcgcaaatt tctgctggcg acccgtggc agccggcgct gtgcggcggtg	360
tttgcgggcg cgctgcgcta tccgcgctat cgctggattg ataaagtgat gattcagctg	420
attatgcgca tgaccggcg cgaaaccgat accagcaaag aagtggaata taccgattgg	480
gaacaggtga aaaaatttgc ggaagatttt gcgaaactga gctataaaaa agcgctg	537

<210> 23

<211> 534

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 23

atgaaagcgc tgattctggt tagcaccgcg gatggccaga cccagaaaat tgcgagcgcg	60
attgcggatg aaattaaagg ccagcagagc tgcgatgtga ttaacattca ggatgcgaaa	120
accctggatt ggcagcagta tgatcgcgctg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat	180
tttcagccgg tgggtgaacga atttgtgaaa cataacctgc tggcgctgca gcagcgcggtg	240
agcggttttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcag cccggaaacc	300
aacgcgtata ccgtgaaatt tctggcgag agcccggtggc agccggattg ctgcgcgggtg	360
tttgcgggcg cgctgtatta tccgcgctat cgctggtttg atcgcgctgat gattcagttt	420
attatgcgca tgaccggcg cgaaaccgat gcgagcaaag aagtggaata taccgattgg	480
cagcaggtgc agcgctttgc gcgcgatttt gcgcagctgc cgggcaaaaag ctat	534

<210> 24

<211> 531

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 24
 atgaaagcgc tgattctgta tagcaccgc gatggccaga cccgcaaaat tgcgagcagc 60
 attgcggatg tgattcgcca gcagcagcag tgcgatgtgc tgaacattaa agatgcgagc 120
 ctgccggatt gggcgagta tgatcgctg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat 180
 tttcagccgg tgggtggataa atttgtgaaa cagcatctgc atgaactgca gcagcgcacc 240
 agcggcctttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcag cccggaaacc 300
 aacgcgtata cccagaaatt tctggcgcat agcccggtggc agccggattg ctgcgcggtg 360
 tttgcgggcg cgctgtatta tccgcgctat cgctggtttg atcgctgat gattcagctg 420
 attatgcgca tgaccggcg cgaaaccgat agcaccaaag aagtggaata taccgattgg 480
 cagcaggtga gcacctttgc gaacgatttt gcgcagctgc cgggcaaaag c 531

<210> 25
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

<400> 25
 gtgaaaacat taattctttt ctcaacaagg gacggacaaa cgcgcgagat tgcctcctac 60
 ctggcttcgg aactgaaaga actggggatc caggcggatg tcgccaatgt gcaccgcatt 120
 gaagaaccac agtgggaaaa ctatgaccgt gtggtcattg gtgcttctat tcgctatgg 180
 cactaccatt cagcgttcca ggaatttgct aaaaaacatg cgacgcggct gaattcgatg 240
 ccgagcgcct ttactccgt gaatctgggtg gcgcgcaaac cggagaagcg tactccacag 300
 accaacagct acgcgcgcaa gtttctgatg aactcgcaat ggcgtcccga tcgctgcgcg 360
 gtcattgccg gggcgctgcg ttaccacgt tategctggc acgaccgttt tatgatcaag 420
 ctgattatga agatgtcagg cggtgaaacg gatacgcgca aagaagttgt ctataccgat 480
 tgggagcagg tggcgaattt cgcccagaaa atcgcccatt taaccgacaa accgacgctg 540
 aaataa 546

<210> 26
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 26
 atgaaagcgc tgattctgtt tagcagccgc gaaggccaga cccgcgaaat tgcgagctat 60
 attgcgaaca gcattaaaga agaaatggaa tgcgatgtgt ttaacattct gcgcgtggaa 120

cagattgatt ggagccagta tgatcgctg ctgattggcg gcagcattca ttatggccat 180
 tttcatccgg cggtagcgaa atttgtgaaa cgccatctgc atgaactgca gcagcgagc 240
 agcggctttt ttgctgtaa cctgaccgag cgcaaagcgg ataaacgcac cccgcagacc 300
 aacgcgtata tgcgcaaatt tctgctgcag agcccgtggc agccggattg ctgctgggtg 360
 tttgctggcg cgctgcgcta taccgctat cgctgggttg atcgctgat gattcagctg 420
 attatgcgca tgaccggcg cgaaaccgat accagcaaag aagtgaata taccgattgg 480
 acccaggtgg cgctgtttgc gcaggaattt gcgcatctgc cgggcaaac ccag 534

<210> 27
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 27
 atgaaagcgc tgattgtgtt tagcagccgc gatggccaga cccgcgcgat tgcgagctat 60
 attgcgaaca ccctgaaagg caccctggaa tgcgatgtgg tgaacgtgct gaacgcgaac 120
 gatattgata tgagccagta tgatcgctg gcgattggcg cgagcattcg ctatggccgc 180
 tttcatccgg cggtagaaca gtttattcgc aaacatctga ccagcctgca gcagctgccg 240
 agcgcgtttt ttagcgtgaa cctgaccgag cgaaaccgg aaaaacgcac cattcagacc 300
 aacgcgtata cccgcaaatt tctgctgaac agcccgtggc agccggatct gtgctgcgtg 360
 tttgctggcg cgctgcgcta tccgcctat cgctgggttg atcgctgat gattcagctg 420
 attatgcgca ttaccggcg cgaaaccgat agcaccaaag aaattgaata taccgattgg 480
 cagcaggtgg cgctgtttgc gcaggatttt gcgcagctgg cggcgaaaaa cccggcg 537

<210> 28
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 28
 atgaagacct tgatcctatt ctccaccagg gacggccaaa cacacaagat cgcaaggcac 60
 atcgaggag tcctcgaaga gcaggggaag gcctgcgagt tggtcgatct gttacagccc 120
 ggcaaccag actggagtag cgttgaatgc gtcgttctag gggccagcat tagatatggt 180
 cacttcata agtctttcat caggttcgta aacactcacg cgcagcgctt gaataatatg 240

ccaggcgccc ttttcacagt taacttagtc gcccgaaagc ccgagaagca gaggccacag 300
 acgaactcctt acacccgcaa gtttctcgcc gcctcccctt ggcagccaca gcgatgccaa 360
 gttttcgcgg gcgctttgag gtaccctagg tactcgtggt acgacagaat gatgatacgt 420
 ttgataatga agatggccgg gggcgagact gacacaagga aggagggtga gtacactgac 480
 tggcagtcgg tgactcgggt cgcgagggag atcgctcagc tgccggggaga gacgcgg 537

<210> 29
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 29
 atgaaagcgc tgattctgtt tagcagccgc gatggccaga cccagctgat tgcgagcagc 60
 attgcgaaag aactggaagg caaacaggcg tgcgatgtgc tgaacattct ggataccacc 120
 aacgtggaat ggaccagta tgatcgctg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat 180
 tttcatccgg cgggtggcga atttgtgaaa cgccatcagc gcgaactgca gcagcgcagc 240
 agcggctttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcag cccggaaacc 300
 aacgcgtata ccgcgaaatt tctgaaccag agcccgtggc agccggattg ctgcgcggtg 360
 tttgcggggc cgctgcgcta tccgcgctat cgctggtttg atcgctattat gattcagctg 420
 attatgcgca tgaccggcgg cgaaaccgat agcagcaaag aagtggaata taccgattgg 480
 cagcaggtga cccgctttgc gcaggaattt gcgcgcctgc cgggcaaaac cagc 534

<210> 30
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 30
 atgaaaaccc tgattctgtt tagcaccgc gatggccaga cccgcgaaat tgcggcgttt 60
 ctggcgagcg aactgaaaga acagggcatt tatgcggatg tgattaacct gaaccgcacc 120
 gaagaaattg cgtggcagga atatgatcgc gtggtgattg gcgcgagcat tcgctatggc 180
 cattttcatc cggcgggtga tcgctttgtg aaaaaacata ccgaaaccct gaacagcctg 240
 ccgggcgcggt tttttagcgt gaacctggtg gcgcgcaaag cggaaaaacg cccccgcag 300
 accaacagct atacccgcaa atttctgctg aacagcccgt ggaaaccggc ggcgtgcgcg 360

gtgtttgcgg gcgcgctgcg ctatccgcgc tategctggg atgategctt tatgattcgc 420
 ctgattatga aaatgaccgg cggcgaaacc gatacccgca aagaagtggg gtataccgat 480
 tggagccagg tggcgagctt tgcgcgcgaa attgtgcagc tgaccgcag cagccgcctg 540

<210> 31
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 31
 atgaaaattc tgattctgtt tagcacccgc gatggccaga cccgcgaaat tgcggcgagc 60
 ctggcgagcg aactgaaaga acaggcgctt gatgtggatg tggatgaacct gcatcgcgcg 120
 gaaaacattg cgtgggaaga atatgatggc gtggtgattg gcgcgagcat tcgctatggc 180
 cattttcata gcaccctgaa cagctttgtg aaaaaacatc agcaggcgct gaaaaaactg 240
 ccggggcgcg tttatagcgt gaacctgggt gcgcgcaaac cggaaaaacg caccgccgag 300
 accaacagct ataccgcaa atttctgctg gatagcccgt ggcagccgga tctgagcgcg 360
 gtgtttgcgg gcgcgctgcg ctatccgcgc tataactggg atgategcat tatgattcgc 420
 ctgattatga aaattaccgg cggcgaaacc gatacccgca aagaagtggg gtataccgat 480
 tggcagcagg tgaccattt tgcgcatgaa attgtgcagc tggcgcgcaa a 531

<210> 32
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 32
 atgaaggcct tgggtactgta ctgcagcgcg gacggccaga cccacgcaat tgcttcatac 60
 atgcctcct gcatgaagga gaaggccgaa tgcgacgtga tcgacctcac ccacggggag 120
 cacgtgaacc tcaccaata cgatcagggtg ctaatcggtg cgagtattcg ttacggccac 180
 ttcaacgccg tgcttgacaa gttcatcaag agaaacgtgg atcagctgaa caacatgcc 240
 agcgcgcttct tctgcgtaaa cctcacagca aggaagcccc agaagcgta tccccagaca 300
 aacccttatg tccgaaaatt cttgcttgc accccctggc agcccgcggt gtgcggagtg 360
 ttgcgagggg cccttcggta cccgcgatac cgggtggatcg acaaggtgat gatccagcta 420
 ataatgcgga tgactggggg agagacagac acgagcaagg aggtcgagta cacggattgg 480

gagcagggtta agaagttcgc ggaggatttt gcaaagctat cgtacaagaa ggccctctag 540

<210> 33
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 33
 atgaaggcct tgatcctgtt ctctacacgc gacggacaga cacagaagat cgcacatctgcc 60
 atcgcctgatg agataaaggg gcagcaatcg tgcgacgtga ttaacataca ggatgccaaa 120
 accctcgact ggcagcagta cgaccgggta ctcacatcgcg cctccattcg ttacggggcat 180
 ttccagccccg ttgtgaatga gtttgtcaag cacaacctct tggccctaca gcagagagtt 240
 tccggattct tctccgtgaa cttgacagcc cgaaagccag agaagcggag ccccgagact 300
 aacgcttata cagtcaaatt cttggcgcag tcaccctggc aaccggactg ctgcgctgtt 360
 tttgcggggg ccctgtacta cccacggtag cgggtggttcg ataggggtgat gatacagttc 420
 ataatgcgaa tgacgggggg agagaccgac gcatcgaaag aggtggagta cactgactgg 480
 cagcaggtgc agcggttcgc gcgagacttc gcgcagttac cgggtaagtc ctactga 537

<210> 34
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 34
 atgaaggcgc tgatcttgta ctcaaccagg gacggtcaga ctcgcaagat tgcaagtagc 60
 attgcggacg tcatcaggca gcagcagcag tgcgacgtct taaacattaa agacgcatca 120
 cttcctgact gggcccaata tgaccgagtg ctcacatcgag ctagcatccg ttacggggcat 180
 ttccagccccg ttgtagacaa gttcgtgaag cagcacttgc acgagcttca gcagcggacc 240
 tccggcttct tctccgtgaa cctgacggcg aggaagcctg aaaaaggag ccctgagacc 300
 aatgcctaca cccagaaaatt cttggcgcac tccccttggc agcccgattg ctgtgccggt 360
 ttgcggggg ccctttacta ccccaggtag cgttggttcg accgggtgat gatccagttg 420
 attatgcgca tgactggtgg agagaccgac tctaccaagg aagtggagta cactgactgg 480
 cagcaggtga gtaccttcgc caacgatttt gccagcttc caggcaagag ctaa 534

<210> 35
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 35
 atgaagacct tgattctatt ctccacaagg gacggccaga ctagggagat cgcttcctac 60
 ctggccagcg agctaaagga gcttggcatt caggcagacg tggctaacgt gcaccgaatt 120
 gaggagccgc agtgggagaa ctacgatcgg gtcgtgatcg gcgccagcat ccggtatgga 180
 cactaccaca gcgcgttcca ggagttcgtg aaaaagcacg cgacccgtct gaatagcatg 240
 ccatcagcgt tctactcggg caacctcgtg gtcgtaagc ccgagaagcg gacaccccag 300
 accaactcgt atgccaggaa gttccttatg aactcgcagt ggcgaccgga ccgctgcgcg 360
 gtgatcgccg gtgcgctcag gtaccctcgt tatagggtgg acgacagggt tatgattaaa 420
 cttataatga aatgagcgg cgagagagacc gacaccagaa aagagggtgg ttacacagac 480
 tgggagcagg tagcaaactt cgctagggag attgctcacc tcaccgacaa gccgaccttg 540
 aagtaa 546

<210> 36
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 36
 atgaaggccc ttatactggt cagttccaga gaaggccaga cgaggagat agcgagttac 60
 attgccaaact cgataaagga ggaaatggaa tgcgacgtgt tcaacatcct tcgtgtggag 120
 cagatcgact ggtctcaata cgaccgcgtc ctgatcgggg gctcgataca ctacggccat 180
 ttccacccag cgggtggcaaa atttgtcaag aggcacctcc atgagttgca acagaggtct 240
 tccggctttt tctgcgtcaa cctgacggcc aggaaggccg acaagcggac tccccagacc 300
 aatgcctaca tgagaaagtt cttgttgag tccccatggc aacccgattg ctgcgcgctg 360
 tttgcggggg cccttaggta caccggttac aggtgggttc acagggtaat gattcagctg 420
 atcatgagga tgacgggcgg agagactgac acatcgaagg aggtggagta cacagactgg 480
 acgcaggctg cccgcttcgc gcaggagttc gcccatthtc ccggcaaaac tcagtga 537

<210> 37
 <211> 540

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 37
 atgaaggctc ttatcgtatt ctcttcgagg gatggccaaa cccgagcgat cgcgtcttat 60
 attgctaata ccctcaaagg gaccctagag tgcgacgtcg tcaacgtcct caatgctaac 120
 gacattgatt tgagccagta cgaccgtgtg gccattggcg cctccattcg ctacgggagg 180
 ttccacccag ctgttaacca gtttatccgg aagcacctta cgagcctcca gcagctacca 240
 tctgcgttct tctccgtgaa cctcacagct cggaagcccg agaagaggac tatacaaacc 300
 aacgcgtaca ctaggaagtt tctactgaac tcgccgtggc agccggacct gtgctgcgtg 360
 ttgcggggag cccttcgcta tccccgttac aggtgggttg accgagtgat gattcaactc 420
 ataatgcgca taacgggggg cgagacagac tccaccaagg agatcgagta caccgactgg 480
 cagcaggtcg cgcgattcgc ccaggatttt gcacagcttg ccgcaaagaa cccggcatga 540

<210> 38
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 38
 atgaagacct tgatcctatt ctccaccagg gacggccaaa cacacaagat cgcaaggcac 60
 atcgcaggag tcctcgaaga gcaggggaag gcctgcgagt tggtcgatct gttacagccc 120
 ggcgaaccag actggagtag cgttgaatgc gtcgttctag gggccagcat tagatatggt 180
 cacttccata agtctttcat caggttcgta aacactcacg cgcagcgctt gaataatatg 240
 ccaggcgccc ttttcacagt taacttagtc gcccgaaagc ccgagaagca gagtccacag 300
 acgaactctt acacccgcaa gtttctcgcc gcctccccctt ggcagccaca gcgatgccaa 360
 gttttcgcgg gcgctttgag gtaccctagg tactcgtagt acgacagaat gatgatacgt 420
 ttgataatga agatggccgg gggcgagact gacacaagga aggaggttga gtacactgac 480
 tggcagtcgg tgactcgggt cgcgaggagg atcgctcagc tgccgggaga gacgcggtag 540

<210> 39
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 39

atgaaggccc taattttatt cagtagtagg gacggccaga cccagcttat agcatcgtct	60
atcgccaagg agctcgaagg gaagcaggcg tgcgacgtgt tgaatatacct cgacacgact	120
aatgtggagt ggaccagta cgaccgctg ctgattggag catccatccg gtacggggcac	180
tttcacctg cggtcgccga gttcgtaaag cgtcaccagc gagagctaca gcagagaagt	240
agtggtctttt tctctgtgaa cttgacggcc cgtaagccgg aaaagaggtc ccccgagact	300
aacgcctata ccgccaagtt ccttaaccaa agtccatggc agcctgactg ttgcgctgtg	360
ttcgctgggg ctttgcgata ccctcggtac cgctggttcg acagaattat gatccagcta	420
atcatgcgga tgactggggg tgagacagat tcttcaaagg aggtcgagta caccgactgg	480
cagcaggtga cccgcttcgc gcaagagttc gccaggcttc cgggaaagac cagttga	537

<210> 40

<211> 543

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 40

atgaagaccc taatactggt ctctaccgc gacgggcaga caagggagat cgccgcgttc	60
cttgccctcg agctgaagga gcaggggatt tacgctgacg tcataaacct taaccggacg	120
gaggagatag cttggcagga gtatgataga gtcgtaatcg gggcgctgat ccgatacggg	180
catttccacc ctgctgtcga ccgcttcgtg aagaagcaca cagagacact caactcactg	240
cccggcgctt ttttctctgt aaaccttggt gcccggaag ccgagaagag aacgccgcag	300
acgaactcat acaccaggaa gttcctatta aacagcccgt ggaagccagc ggccctgcgcg	360
gtctttgctg gggccctccg ctaccctaga taccgctggt acgacagggt catgatacga	420
ctgattatga aaatgacagg cggggagacg gatacccgaa aggaggtagt ctacactgac	480
tggtcgcagg tcgctcgtt tgccagagag atagtccagt tgaccaggtc atcgcgcttg	540
tga	543

<210> 41

<211> 534

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 41
 atgaagatat taatcctttt ctccaccggt gacggccaaa cccgtgagat tgcgggcgccc 60
 ttggcgctccg aactcaagga gcaggcattc gacgtggacg tcgtcaacct tcaccggggc 120
 gagaacatcg catgggagga gtacgacggg gttgtcatcg gagcggtccat caggtacggc 180
 cactttcata gtaccctgaa ctcatctgtc aagaagcatc agcaggctct taagaagctt 240
 cccgggggctt tctacagcgt gaacctcgtc gcccgggaagc ctgagaagcg cacaccgcag 300
 accaatagct acaccgcaa gttcctcttg gattccccgt ggcagcccga cctttcagcc 360
 gtgttcgccc gggcactcag gtaccctcgg tacaattggg acgaccgtat catgattaga 420
 cttatcatga agattacagg cggcgagact gataccagga aggaagtagt ctacacagag 480
 tggcagcagg tcactcactt tgctcacgag atcgtccagc tcgtgcggaa gtag 534

<210> 42
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 42
 aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc 60
 gectcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctaccca cggggagcac 120
 gtgaacctca cccaatacga tcagggtgcta atcgggtgcga gtattcgta cggccacttc 180
 aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaaagc 240
 gcgttcttct gcgtaaacct cacagcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac 300
 ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc ccctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc 360
 gcagggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420
 atgcggatga ctggggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattggggag 480
 cagggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatcgt acaagaaggc cctctag 537

<210> 43
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 43
 aaggccttga tcctgttctc tacacgcgac ggacagacac agaagatcgc atctgccatc 60
 gctgatgaga taaaggggca gcaatcgtgc gacgtgatta acatacagga tgccaaaacc 120

ctcgactggc agcagtacga cccgggtactc atcggcgccct ccattcgtta cgggcatttc 180
cagcccgttg tgaatgagtt tgtcaagcac aacctcttgg ccctacagca gagagtttcc 240
ggattcttct cccgtgaactt gacagcccga aagccagaga agcggagccc cgagactaac 300
gcttatacag tcaaatctct ggcgagtc ccttggaac cggactgctg cgctgttttt 360
gcggggggccc tgtactaccc acggtaccgg tggttcgata gggatgatgat acagttcata 420
atgcgaatga cggggggaga gaccgacgca tcgaaagagg tggagtacac tgactggcag 480
caggtgcagc ggttcgcgcg agacttcgcg cagttaccgg gtaagtctta ctga 534

<210> 44
<211> 543
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 44
aagaccttga ttctattctc cacaaggac ggccagacta gggagatcgc ttcctacctg 60
gccagcgagc taaaggagct tggcattcag gcagacgtgg ctaacgtgca ccgaattgag 120
gagccgcagt gggagaacta cgatcgggtc gtgatcggcg ccagcatccg gtatggacac 180
taccacagcg cgttccagga gttcgtgaaa aagcacgcga cccgtctgaa tagcatgcca 240
tcagcgttct actcgggtcaa cctcgtgggt cgtaagcccg agaagcggac accccagacc 300
aactcgtatg ccaggaagtt ccttatgaac tcgcagtggc gaccggaccg ctgcgcgggtg 360
atcgccgggtg cgctcaggtta ccctcgttat aggtgggtacg acaggtttat gattaaactt 420
ataatgaaaa tgagcggcgg agagaccgac accagaaaag aggtgggttta cacagactgg 480
gagcaggtag caaacttcgc tagggagatt gctcacctca ccgacaagcc gaccttgaag 540
taa 543

<210> 45
<211> 534
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 45
aaggccctta tactgttcag ttccagagaa ggccagacga gggagatagc gagttacatt 60
gccaactcga taaaggagga aatggaatgc gacgtgttca acatccttcg tgtggagcag 120
atcgactggg ctcaatacga ccgcgtcctg atcggggggt cgatacacta cggccatttc 180

caccacagcgg tggcaaaatt tgtcaagagg cacctccatg agttgcaaca gaggtcttcc 240
 ggctttttct gcgtcaacct gacggccagg aaggccgaca agcggactcc ccagaccaat 300
 gcctacatga gaaagttctt gttgcagtcc ccatggcaac ccgattgctg cgccgtgttt 360
 gcggggggccc ttaggtacac ccgttacagg tggttcgaca gggtaatgat tcagctgac 420
 atgaggatga cgggcggaga gactgacaca tcgaaggagg tggagtacac agactggacg 480
 caggtcgccc gcttcgcgca ggagttcgcc catttgcccc gcaaaactca gtga 534

<210> 46
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 46
 aaggctctta tcgtattctc ttcgagggat ggccaaaccc gagcgatcgc gtcttatatt 60
 gctaataccc tcaaaggagc cctagagtgc gacgtcgtca acgtcctcaa tgctaacgac 120
 attgatttga gccagtacga ccgtgtggcc attggcgctt ccattcgcta cgggaggttc 180
 caccacagctg ttaaccagtt tatccggaag caccttacga gcctccagca gctaccatct 240
 gcgttcttct ccgtgaacct cacagctcgg aagcccgaga agaggactat acaaaccaac 300
 gcgtacacta ggaagtttct actgaactcg ccgtggcagc cggacctgtg ctgcgtgttc 360
 gcgggagccc ttcgctatcc ccgttacagg tggtttgacc gagtgatgat tcaactcata 420
 atgcgcataa cggggggcga gacagactcc accaaggaga tcgagtacac cgactggcag 480
 caggtcgcgc gattcgccca ggattttgca cagcttgccg caaagaaccc ggcatga 537

<210> 47
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 47
 aagaccttga tcctattctc caccaggagc ggccaaacac acaagatcgc aaggcacatc 60
 gcaggagtcc tcgaagagca ggggaaggcc tgcgagttgg tcgatctgtt acagcccggc 120
 gaaccagact ggagtaccgt tgaatgcgtc gttctagggg ccagcattag atatggtcac 180
 ttccataagt ctttcatcag gttcgtaaac actcacgcgc agcgcttgaa taatatgcc 240
 ggcgcccttt tcacagttaa cttagtcgcc cgaaagcccg agaagcagag tccacagacg 300

aactcttaca cccgcaagtt tctcgccgcc tccccttggc agccacagcg atgccaagtt 360
 ttcgcgggcg ctttgaggta ccctaggtac tcgtggtacg acagaatgat gatacgtttg 420
 ataataaaga tggccggggg cgagactgac acaaggaagg aggttgagta cactgactgg 480
 cagtcggtga ctcggttcgc gagggagatc gctcagctgc cgggagagac gcggtag 537

<210> 48
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 48
 aagaccctaa tactgttctc tacccgcgac gggcagacaa gggagatcgc cgcgttcctt 60
 gcctcggagc tgaaggagca ggggatttac gctgacgtca taaaccttaa ccggacggag 120
 gagatagctt ggcaggagta tgatagagtc gtaatcgggg cgtcgatccg atacgggcat 180
 ttccaccctg ctgtcgaccg cttcgtgaag aagcacacag agacactcaa ctcactgccc 240
 ggcgcctttt tctctgtaaa ctttgttgcc cggaaagccg agaagagaac gccgcagacg 300
 aactcataca ccaggaagtt cctattaaac agcccgtgga agccagcggc ctgcgcggtc 360
 tttgctgggg ccctccgcta ccctagatac cgctggtacg acaggttcat gatacgactg 420
 attatgaaaa tgacaggcgg ggagacggat acccgaaagg aggtagtcta cactgactgg 480
 tcgcaggtcg cgtcgtttgc cagagagata gtccagttga ccaggtcatc gcgcttgtga 540

<210> 49
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 49
 aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc 60
 gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac 120
 gtgaacctca cccaatacga tcaggtgcta atcggtgcga gtattcgta cggccacttc 180
 aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaagc 240
 gcgtttcttct gcgtaaacct cacggcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac 300
 ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc ccctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc 360
 gcagggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420

atgcggatga ctgggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattgggag 480
caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatcgt acaagaaggc cctctag 537

<210> 50
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 50
aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc 60
gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac 120
gtgaacctca cccaatacga tcagggtgcta atcgggtgcga atattcgta cggccacttc 180
aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaaagc 240
gcgttcttct gcgtaaacct cacagcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac 300
ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc ccctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc 360
gcaggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420
atgcggatga ctgggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattgggag 480
caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatcgt acaagaaggc cctctag 537

<210> 51
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 51
aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc 60
gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac 120
gtgaacctca cccaatacga tcagggtgcta atcgggtgcga gtattcgta cggccacttc 180
aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaaagc 240
gcgttcttct gcgtaaacct cacagcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac 300
ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc ccctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc 360
gcaggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420
atgcggatga ctgggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattgggag 480
caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatagt acaagaaggc cctctag 537

<210> 52
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 52
 aaggccttga tcctgtttctc tacacgcgac ggacagacac agaagatcgc atctgccatc 60
 gctgatgaga taaaggggca gcaatcgtgc gacgtgatta acatacagga tgccaaaacc 120
 ctcgactggc agcagtacga ccgggtactc atcggcgcct ccattcgtta cgggcatttc 180
 cagcccgttg tgaatgagtt tgtcaagcac aacctcttg ccctacagca gagagtttcc 240
 ggattcttct cctgaactt gacagcccga aagccagaga agcggagccc cgagactaac 300
 gcttatacag tcaaattctt ggcgcagtca ccctggcaac cggactgctg cgctgttttt 360
 gcggggggccc tgtactaccc acggtaccgg tggttcgata gggatgatgat acagttcata 420
 atgcgaatga cgggggggga gaccgacgca tcgaaagagg tggagtacac tgactggcag 480
 caggtgcagc ggttcgcgcg agacttcgcg cagttaccgg gtaagtccta ctga 534

<210> 53
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 53
 aagaccctaa tactgtttctc taccgcgcac gggcagacaa gggagatcgc cgcgttcctt 60
 gcctcggagc tgaaggagca ggggatttac gctgacgtca taaaccttaa ccggacggag 120
 gagatagctt ggcaggagta tgatagagtc gtaatcgggg cgtcgatccg atacgggcat 180
 ttccaccctg ctgtcgaccg cttcgtgaag aagcacacag agacactcaa ctcaactgcc 240
 ggcgcctttt tctctgtaaa ccttggtgcc cggaaagccg agaagagaac gccgcagacg 300
 aactcatata ccaggaagtt cctattaaac agcccgtgga agccagcggc ctgcgcggtc 360
 tttgctgggg ccctccgcta ccctagatac cgctggtacg acaggttcat gatacgactg 420
 attatgaaaa tgacaggcgg ggagacggat acccgaaagg aggtagtcta cactgactgg 480
 tcgcagatcg cgtcgtttgc cagagagata gtccagttga ccaggtcac gcgcttggtga 540

<210> 54
 <211> 540

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 54
 atgaaggcgc tcgtgctcta cagcacacgc gacggccaga ctcatgcat cgcctcttac 60
 atcgcgtcct gtatgaagga gaaggccgag tgcgacgtca tcgatctcac gcacggggag 120
 cagtggaatc ttacgcagta cgaccaagtg ctgataggcg cctctatccg ttacggccat 180
 tttaacgccg tcctcgacaa attcatcaag cgcaatgtag accagctgaa caacatgccc 240
 tccgcgttct tttgcgtgaa cctgacggct cggaagcctg agaagcgaac acctcagacc 300
 aaccatacgc tgcggaaatt cctactcgca acgccatggc agcccgccct gtgcgggggtt 360
 ttcgcagggg cgctacgcta tccgcgttac cgctggatcg ataaggatgat gatccagcta 420
 ataatgcgca tgaccggcgg cgagacagac acatcgaagg aagtcgaata cacagactgg 480
 gaacaggtga agaagtttgc agaggatttc gccaaagctct catacaaaaa ggcattgtga 540

<210> 55
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 55
 atgaaggcgc ttatactgtt ctgcacacgc gacggtcaga cgcagaaaat cgcctcagcc 60
 atgcgccgacg agatcaaggg ccagcagagc tgcgatgtga tcaatattca ggacgccaaa 120
 actctcgact ggcagcagta tgaccgcgtg ctcatggcg catcaatccg ctacgggcat 180
 ttccagccag tcgtcaatga gtttgtgaaa cataacctct tggcattgca gcagcgggtg 240
 tctggcttct tctccgtgaa ccttacagct agaaaaccag agaagcggtc gcccgagact 300
 aacgcctaca ccgttaagtt ccttgccgag tcaccgtggc agcctgattg ctgcgcggtc 360
 ttcgccgggg cactgtacta ccctcgatac cgggtggttg atagggtaat gatccagttc 420
 ataatgcgca tgaccgggtg ggagaccgac gcaagtaaag aagttgagta cacggattgg 480
 cagcaggtgc aaaggttcgc acgcgacttc gcgcagctcc cgggcaagtc ttactga 537

<210> 56
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 56
 atgaaagccc tgatcctcta ttccaccagg gacggccaga cccgcaagat agcctcctcc 60
 atcgctgatg tcatccgcca gcagcagcag tgcgacgttt taaacattaa ggacgcttca 120
 ctgcctgatt gggcccagta tgaccgcgtc ctgatcggcg cgtcgattcg gtacggccac 180
 ttccagcctg tggttgacaa gttcgtcaag cagcacctgc atgagctgca gcagcgaact 240
 agcgggttct tcagtgtgaa cctgacagct agaaagcccg aaaagagatc cccagaaacc 300
 aacgcctata cgcagaaatt ccttgetcac tcaccctggc agcctgactg ttgtgccgtc 360
 ttgcggggcg ccttgtacta tccccgctac cgctgggttcg ataggggtgat gatccagctg 420
 attatgagaa tgacgggagg ggagaccgat tcgaccaagg aggtagagta cactgactgg 480
 caacaggtgt caactttcgc aaacgacttc gcacaactac ccggttaagtc ttga 534

<210> 57
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 57
 atgaaaaccc taatactgtt ctcgaccgcg gacggccaga cgcgtagat tgcgagctac 60
 ctggcctccg agctcaagga gctggggatc caagccgatg tcgcaacgt gcaccgcatt 120
 gaggagccgc agtgggagaa ttacgatcgc gttgtgatag gggccagcat ccgctatggc 180
 cactaccact cggcctttca ggagtttgta aagaacacg ccacaagatt aaactccatg 240
 cctagcgcct tctactccgt caaccttgtc gcgcgcaagc cggagaagcg gacacctcag 300
 acgaactcct acgcgcggaa gttcctgatg aacagccagt ggcggccgga cagatgtgct 360
 gttattgcgg gagccctgag ataccgagg taccggtggg acgatagggt tatgattaaa 420
 cttattatga agatgtctgg tggggagact gacaccagga aggaggtggg atatacagac 480
 tgggagcagg tcgccaattt cgctcgggaa atcgcgcatc tgacagacaa gcctacactg 540
 aagtag 546

<210> 58
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 58
 atgaaggccc tgatcctctt tagctctagg gagggccaga cccgcgagat cgcgctcatat 60
 atcgcggaatt ccataaagga ggagatggag tgcgatgtgt ttaacatcct taggggtggag 120
 caaatagact ggtctcagta tgaccgtgtg ctcatagggg ggagcatcca ctacggccac 180
 tttcaccgga cgtggcgaa attcgtcaag cgacacctcc acgagcttca gcagcgctcc 240
 tcaggggttct tctgctcaa cctgacagca agaaaggcag ataaacgcac cccgcagacg 300
 aacgcctaca tgaggaagtt ccttctgcag tctccttggc agcccgattg ctgcgcggtg 360
 ttcgcccgtg cactgcgcta tacgcgctat agatggtttg atagagtcac gattcagctc 420
 atcatgcgga tgaccggcgg ggaaacggat actagtaagg aggtggagta cacggactgg 480
 acccaggtgg cacgtttcgc ccaggagttt gcacatcttc ctgggaagac ccaatga 537

<210> 59
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 59
 atgaaggcgc taattgtgtt cagctccagg gatggccaga cgagggctat agcatcctat 60
 atcgccaata ccttgaaagg aacgctcgag tgtgacgtgg tcaacgtctt gaacgccaat 120
 gacattgacc tttcccagta cgaccgagtt gccataggcg cgtcgatccg ctacgggcga 180
 tttcaccctg cagtcaacca gtttatacgg aagcatttga cctcgctgca gcagctcccg 240
 tcagccttct tctctgtgaa tttaaccgcg cggaagcctg agaaacggac gatccaaaca 300
 aacgcctata cccgaaagtt cctcctgaac agcccatggc agccagacct gtgctgtgtc 360
 ttcgcccggc cgttgcggtg tccccgctac aggtggttcg atagagtgat gatccagctc 420
 atcatgagga tcaccggggg agagaccgat agtaccaagg agatcgagta cacggactgg 480
 cagcaggtgg ctgccttcgc ccaggacttc gtcagttgg ccgcaaagaa tccagcataa 540

<210> 60
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 60
 atgaagacac tgatcctgtt ctcgactcga gatggccaga ctcataaaat tgcgcgccac 60
 attgcggggg tcttgaggga gcagggcaaa gcgtgcgagc tcgtggactt actccagccc 120

ggggagccgg actggagcac ggtggagtgc gtcgttctgg gcgcttccat acgttacggg 180
 catttccaca aaagtttcat ccggttcgtc aacaccacg ctcaacggct gaacaacatg 240
 cctggcgcgc tattcactgt taacttagtg gtcgtaagc ccgagaagca gtctccgcag 300
 actaactcct acacaaggaa atttctagca gcaagcccat ggcaaccgca gcggtgccag 360
 gtgttcgctg gagctctgcg ctatcctagg tacagttggg acgacagaat gatgatacgg 420
 ttgattatga agatggcagg cggggagacg gacaccagga aagaggtcga atacactgac 480
 tggcaatcag tcactcgggt tgctagagag atcgcgcaat taccaggtga gacgcggtaa 540

<210> 61
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 61 60
 atgaaggctc tcatactgtt cagctcgaga gacgggcaga cccagctgat cgctcctcc
 atagcaaagg agctagaggg caagcaagcc tgcgacgtgc tcaatattct cgacacaacc 120
 aacgtggagt ggactcagta cgacagagtc ctaatcggcg cgtccatcag atacggccac 180
 ttccatcccc ccgtcgctga attcgtgaaa cgccaccagc gtgagctcca gcagcgcagc 240
 agcggcttct tcagcgtgaa tcttactgcg agaaagccgg aaaagcggag tcccagact 300
 aacgcttata cggcaaagtt cctcaaccaa tctccctggc aaccagactg ctgtgccgtg 360
 ttcgtggggg cactgaggta tccgcgctat cgggtggttcg atagaatcat gatacagctg 420
 ataatgcgta tgactgggtg ggagacggat tccagtaaag aggtagagta tactgattgg 480
 cagcaggtca ctaggttcgc gcaggagttt gctaggctgc cgggcaagac atcctga 537

<210> 62
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 62 60
 atgaaaacct taatcttgtt cagcacccgc gacggccaga cgcgtgaaat cgcagcgttc
 ctcgcttcgg agctcaagga acagggaatt tacgccgacg tcattaacct aaaccgtacc 120
 gaagagattg cgtggcagga gtatgaccgc gtggtgattg gcgcttctat ccgctatggc 180
 cacttccacc cggctgttga ccggttcgtg aagaagcaca cggagacctt gaactcactg 240

ccgggggcat tcttttagcgt aaatctggtg gcgcgcaagg ccgagaagcg cccccccag 300
 acgaacagct acacccgcaa atttttactt aactccccat ggaaacctgc ggcttgcgca 360
 gtgttcgcag gagctctccg ctatcctcgc tatcgatggt acgatcgggt catgattcgg 420
 ctgattatga aaatgacggg cggcgagacg gatacgcgaa aggaagttgt ctacactgac 480
 tgggtcccagg tggcctcggt tgcaagggag atcgtacagc tcaactcgatc tagtaggctc 540
 tga 543

<210> 63
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 63
 atgaagattc tcattcttatt ttccaccgga gacggccaaa cccgcgagat tgcggcgctcc 60
 ctgcctccg agttgaagga gcaggcggtt gatgtggatg tggtaacct ccaccgcgca 120
 gaaaacatag cgtgggagga gtacgatggg gtcgtcatcg gagcgtcaat ccgctacgga 180
 catttccact caacgctgaa ttcatctgtg aagaagcacc aacaagcgct caagaagctg 240
 cccggagcat tctacagcgt caacctcgtg gctcggaagc cggaaaagcg cccccgcaa 300
 acaaacagct acacacgcaa gttttctgctc gactcgccct ggcaaccgga cctgagtgcc 360
 gttttcgcg gggcactgcg ctatccccgt tacaactggt acgatcgcgt aatgattcga 420
 ctgatcatga agattacagg cggggaaacc gatactcgga aggaggtggt gtatacagac 480
 tggcagcagg ttaccactt cgcccacgag atcgtccagc tcgttcgtaa gtga 534