



(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)



1-0036300

(51)⁷ C12N 15/82; C12N 15/63; C07K 14/195; (13) B
C12N 1/12

(21) 1-2018-05653

(22) 15/06/2017

(86) PCT/KR2017/006275 15/06/2017

(87) WO 2017/217793 21/12/2017

(30) 10-2016-0075358 16/06/2016 KR

(45) 25/07/2023 424

(43) 27/05/2019 374A

(73) FARMHANNONG CO., LTD. (KR)

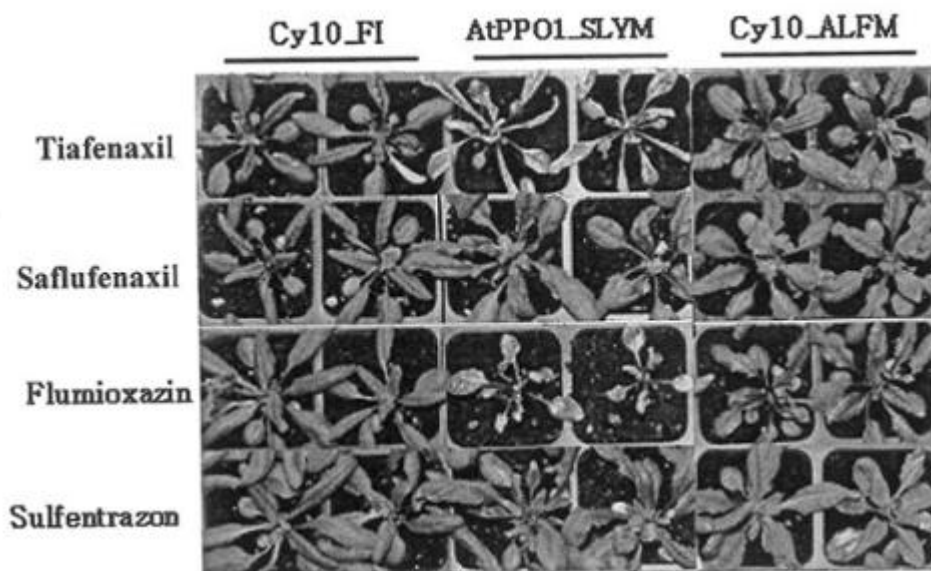
24, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07320, Republic of Korea

(72) SUNG, Soon-Kee (KR); YOON, Joonseon (KR); HAN, Yunjung (KR); AHN, Young Ock (KR); PARK, Joonghyuk (KR); HONG, Myoung-Ki (KR).

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

(54) POLYPEPTIT BIẾN THỂ CỦA PROTOPORPHYRINOGEN OXIDAZA, CHẾ PHẨM TẠO RA VÀ/HOẶC TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU THUỐC DIỆT CỎ CỦA CÂY TRỒNG CHỨA POLYPEPTIT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CỎ ĐẠI

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tăng cường và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tạo sử dụng protoporphyrinogen oxidaza thu được từ sinh vật nhân sơ hoặc biến thể axit amin của nó.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến enzym protoporphyrinogen oxidaza thu được từ sinh vật nhân sơ hoặc biến thể của nó, và phương pháp tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tảo sử dụng enzym này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Con đường sinh tổng hợp porphyrin có chức năng tổng hợp chất diệt lục và hem, là những yếu tố đóng vai trò thiết yếu trong quá trình trao đổi chất của cây, và nó diễn ra trong lục lạp. Trong con đường này, protoporphyrinogen IX oxidaza (sau đây, được gọi là PPO; EC:1.3.3.4) xúc tác quá trình oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX. Sau quá trình oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX, protoporphyrin IX liên kết với magiê nhờ Mg-chelatase để tổng hợp chất diệt lục, hoặc nó liên kết với sắt nhờ Fe-chelatase để tổng hợp hem.

Do đó, khi hoạt tính PPO bị ức chế, việc tổng hợp chất diệt lục và hem bị ức chế và cơ chất protoporphyrinogen IX rời khỏi con đường sinh tổng hợp porphyrin thông thường, dẫn đến việc đi ra nhanh chóng của protoporphyrinogen IX từ lục lạp sang tế bào chất, và sự tích lũy protoporphyrin IX trong tế bào chất do quá trình oxy hóa. Protoporphyrin IX đã tích lũy tạo ra oxy đơn bội có độ phản ứng cao (1O_2) khi có mặt ánh sáng và phân tử oxy làm phá hủy màng tế bào và nhanh chóng dẫn đến sự chết tế bào cây trồng. Trên cơ sở nguyên tắc này, các thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO đã được phát triển. Cho đến nay, đã có 9 họ thuốc diệt cỏ ức chế PPO, bao gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphtalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinedion, và các thuốc diệt cỏ khác, được phân loại theo cấu trúc hóa học của chúng.

Ngoài ra, để ngăn ngừa ảnh hưởng của các thuốc diệt cỏ này đến sự sinh trưởng của cây trồng trong khi sử dụng thuốc diệt cỏ, có nhu cầu tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cho cây trồng.

Trong khi đó, tảo là sinh vật quang hợp có thể chuyển hóa năng lượng ánh sáng thành hóa năng mà có thể được sử dụng để tổng hợp nhiều hợp chất hữu ích khác nhau. Ví dụ, tảo có thể cố định cacbon nhờ quá trình quang hợp và chuyển hóa cacbon dioxit thành đường, tinh bột, lipit, chất béo, hoặc các phân tử sinh học khác, nhờ đó loại bỏ khí nhà kính ra khỏi khí quyển. Ngoài ra, việc trồng tảo quy mô lớn có thể tạo ra nhiều loại cơ chất khác nhau như enzym công nghiệp, hợp chất và protein trị liệu, dưỡng chất, chất thương mại và chất đốt.

Tuy nhiên, trong trường hợp nuôi trồng tảo quy mô lớn trong thiết bị phản ứng sinh học hoặc trong hồ để hở hoặc được bao quanh, sự nhiễm tạp có thể xảy ra bởi các sinh vật cạnh tranh không mong muốn, ví dụ, tảo, nấm, luân trùng, hoặc động vật phù du không mong muốn.

Do đó, công nghệ là cần thiết để thu hoạch cây trồng và/hoặc tảo mong muốn ở quy mô lớn bằng cách xử lý thuốc diệt cỏ ở nồng độ mà sẽ ức chế sự sinh trưởng của các sinh vật cạnh tranh không có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, sau khi tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cho cây trồng và/hoặc tảo mong muốn.

Tài liệu tham khảo

(Tài liệu sáng chế 1) Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số công bố US 6,308,458 (2001.10.30)

(Tài liệu sáng chế 2) Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số công bố US 6,808,904 (2004.10.26)

(Tài liệu sáng chế 3) Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số công bố US 7,563,950 (2009.07.21)

(Tài liệu sáng chế 4) Công bố đơn sáng chế quốc tế (2011.07.14)

(Tài liệu không phải sáng chế 1) Li X, Volrath SL, Chilcott CE, Johnson MA, Ward ER, Law MD, Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize. Plant physiology 133:736-747, 2003

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Trong bản mô tả này, nhận thấy rằng gen PPO kiểu hemY thu được từ sinh vật nhân sơ và thể đột biến của nó có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ rộng rãi đối với thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO), và do đó được đề xuất là nếu

cung cấp gen này cho cây trồng và/hoặc tảo, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được tạo ra và/hoặc được tăng cường.

Một phương án đề xuất biến thể polypeptit chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

(1) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 2 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của SEQ ID NO: 2 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO) lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc

(2) trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự với trình tự axit amin (1) là 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn.

Một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 2, có thể là một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360, và I408, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Phương án khác đề xuất biến thể polypeptit chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

(1) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 4 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết được nêu trong SEQ ID NO: 4 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO) lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc

(2) trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (1).

Một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 4, có thể là một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353, và F373, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Phương án khác đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể polypeptit.

Phương án khác đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit.

Phương án khác đề xuất tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp.

Phương án khác đề xuất chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm:

polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4, biến thể polypeptit của nó như được mô tả ở trên, và polypeptit có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với polypeptit hoặc biến thể polypeptit này;

polynucleotit mã hóa polypeptit, biến thể polypeptit, và polypeptit có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với polypeptit hoặc biến thể;

vector tái tổ hợp chứa polynucleotit; và

tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể chứa trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1, và polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4 có thể chứa trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ có thể là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ có thể là một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphthalimit, phenyleste, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidindion và các thuốc diệt cỏ khác, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ có thể là một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ được chọn từ nhóm gồm butafenacil, saflufenaxil, benzfendizon, tiafenaxil, fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, axifluorfen, bifenox, etoxyfen, lactofen, chlometoxyfen, chlorintofen, floglycofen-ethyl, halosafen, pyraflufen-ethyl, fluazolat, flumioxazin, cinidon-ethyl, flumiclorac-pentyl, fluthiacet, thidiazimin, oxadiargyl, oxadiazon, carfentrazon, sulfentrazon, azafenidin, pentoxazon, pyraclonil, flufenpyr-ethyl, profluazol, phenopylat (2,4-diclophenyl 1-pyrolidincarboxylat), chất tương tự cacbamat của phenopylat (ví dụ, chất tương tự O-phenylpyrolidino- và piperidinocacbamat (tham khảo “Ujjana B. Nandihalli, Mary V. Duke, Stephen O. Duke, Relationships between

molecular properties and biological activities of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(10) 1993-2000”), muối chấp nhận được trong nông nghiệp của nó, và tổ hợp của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Cây trồng là sinh vật nhân chuẩn đa bào có khả năng quang hợp, có thể là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm, và có thể là cây thảo mộc hoặc cây lấy gỗ. Tảo là sinh vật đơn bào có khả năng quang hợp, có thể là tảo không nhân hoặc tảo có nhân chuẩn.

Theo một phương án, cây trồng và tảo được thao tác di truyền để có thêm polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó, và phạm vi chống chịu thuốc diệt cỏ rộng hơn đối với thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được tạo ra và/hoặc được tăng cường. Cây trồng và tảo được thao tác di truyền để có thêm polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chế phẩm để tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ trong đó polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó được bao gồm thêm. Do đó, chế phẩm để tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế sự phân bào, thuốc diệt cỏ ức chế sự quang hợp, thuốc diệt cỏ ức chế sự tổng hợp axit amin, thuốc diệt cỏ ức chế plastit, và thuốc diệt cỏ ức chế màng tế bào, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi glyphosat, glufosinat, dicamba, 2,4-D(axit 2,4-diclophenoxyaxetic), isoxaflutol, thuốc diệt cỏ ức chế ALS(axetolactat synthaza), thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II, thuốc diệt cỏ gốc phenylure, thuốc diệt cỏ gốc bromoxynil, và tổ hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm EPSPS chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza chống chịu glyphosat), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza) hoặc glyphosat decarboxylaza); PAT (phosphinothrixin-N-axetyltransferaza) chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat; DMO (dicamba monooxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba; 2,4-D monooxygenaza

hoặc AAD (aryloxyalkanoat dioxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D; ALS (axetolactat Synthaza) chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS, AHAS (axit axetohydroxy synthaza), hoặc Athahasl (Cấu trúc dưới phân tử lớn axit axetohydroxy synthaza); protein D1 của hệ quang hóa II chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; cytochrom P450 chống chịu thuốc diệt cỏ gốc phenylure; HPPD (hydorxylphenylpyruvat dioxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế plastit; nitrilaza chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, gen mã hóa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm gen cp4 epsps, epsps (AG), mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 hoặc gat4621 chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat; gen bar, pat hoặc pat (SYN) chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat; gen dmo chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba; gen AAD-1, AAD-12 chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D; ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, SurA hoặc SurB chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS; gen psbA chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; gen CYP76B1 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure; gen HPPDPF W336 chống chịu thuốc diệt cỏ isoxaflutol và gen bxn chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp của chúng, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Phương án khác đề xuất thể biến nạp của cây trồng và/hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, được biến nạp với polynucleotit, hoặc dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó.

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo ra cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, bao gồm bước biến nạp cây trồng và/hoặc tảo với polynucleotit.

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tảo, bao gồm bước biến nạp cây trồng và/hoặc tảo với polynucleotit.

Việc biến nạp có thể được thực hiện trên tế bào của tảo và/hoặc tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây trồng.

Thể biến nạp có thể là tảo, và/hoặc tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây trồng.

Phương án khác đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt bao gồm:

bước cung cấp cây trồng chứa một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm gồm polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc 4, biến thể polypeptit, polynucleotit mã hóa của nó, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit này, và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp cho đất trồng trọt; và

bước sử dụng liều có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt (hoặc cho cây trồng).

Theo phương án cụ thể, bước sử dụng liều có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt có thể được thực hiện bằng cách sử dụng lần lượt hoặc đồng thời liều có hiệu quả của hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

Theo phương án khác, cây trồng có thể được thao tác gen để còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa polypeptit này, và liều có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được sử dụng lần lượt hoặc đồng thời.

Phương án khác đề xuất phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn ra khỏi môi trường nuôi trồng, bao gồm bước cung cấp tảo chứa một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm polypeptit, biến thể polypeptit, polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể polypeptit, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp cho môi trường nuôi trồng, và bước sử dụng liều có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

Giải pháp kỹ thuật

Sáng chế đề xuất công nghệ tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo.

Trong bản mô tả, ‘tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo’ hoặc ‘tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo’ được hiểu là tạo ra khả năng chống chịu ở cây trồng hoặc tảo không có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc nghĩa rộng là bao gồm cả hai.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, ‘gồm trình tự,’ ‘về cơ bản là gồm trình tự,’ hoặc ‘chứa trình tự’ được sử dụng để mang nghĩa cả hai trường hợp là chứa trình tự được mô tả, hoặc nhất thiết phải chứa trình tự này, và có thể được hiểu là mang nghĩa là chứa trình tự khác trình tự được mô tả và/hoặc chứa đột biến (bổ sung, làm khuyết và/hoặc thay thế axit amin hoặc axit nucleic), miễn là duy trì được hoạt tính thực chất của phân tử protein, polypeptit, hoặc axit nucleic và thể hiện chức năng dự định.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều biến thể polypeptit được chọn từ nhóm gồm:

biến thể polypeptit chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 2 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết được nêu trong SEQ ID NO: 2 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO), lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác với axit amin ban đầu, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó; và

biến thể polypeptit chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 4 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết được nêu trong SEQ ID NO: 4 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO), lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng khác axit amin khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể polypeptit, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp. Polynucleotit có thể được thiết kế sao cho codon được tối ưu hóa được chứa trong tế bào cần được biến nạp trong số các codon mã hóa mỗi axit amin. Codon được tối ưu hóa có thể dễ dàng được biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này (ví dụ, tham khảo "<http://www.genscript.com/codon-opt.html>", "<http://sg.idtdna.com/CodonOpt>" v.v.).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm:

polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4, biến thể polypeptits của nó, và polypeptit có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó;

polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể polypeptit;

vector tái tổ hợp chứa polynucleotit; và

tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp.

Ví dụ, polynucleotit mã hóa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2 có thể chứa trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1, và polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4 có thể chứa trình tự polynucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Phương án khác đề xuất thể biến nạp của cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, được biến nạp với polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể polypeptit. Polynucleotit có thể được thiết kế sao cho codon được tối ưu hóa được chứa trong tế bào cần được biến nạp trong số các codon mã hóa mỗi axit amin. Codon được tối ưu hóa có thể dễ dàng được biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này (ví dụ, tham khảo "<http://www.genscript.com/codon-opt.html>", "<http://sg.idtdna.com/CodonOpt>" v.v.).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, bao gồm bước biến nạp tảo, hoặc tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây trồng với polynucleotit.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, bao gồm bước biến nạp tảo, hoặc cây trồng tế bào, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây với polynucleotit.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Polypeptit có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc 4, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc 4 và biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả là protein PPO thu được từ sinh vật nhân sơ (ví

dụ, vi khuẩn lam), và là protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Cụ thể là, protein PPO thu được từ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 được đề xuất, và nó được chỉ định là CyPPO10, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2, và trình tự nucleotit của gen mã hóa nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1. Ngoài ra, PPO thu được từ chủng *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab được đề xuất, và nó được chỉ định là CyPPO13, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4, và trình tự nucleotit của gen mã hóa nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3.

Trong bản mô tả, polypeptit và biến thể của polypeptit được mô tả ở trên có thể được biểu hiện lần lượt dưới dạng protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Ngoài ra, khi được sử dụng trong bản mô tả, “PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó” có thể được sử dụng để mang nghĩa là protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ ở trên, gen mã hóa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc gen mã hóa biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc tất cả chúng.

Protein PPO thu được từ vi khuẩn lam có hoạt tính enzym tốt hơn PPO của cây trồng, và các protein PPO này có thể đem lại khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO và tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ bằng cách chứa đột biến axit amin trong khoảng duy trì được toàn bộ hoạt tính enzym thực chất so với protein PPO kiểu dại. Đột biến axit amin này có thể chứa phần thế, phần khuyết, phần bổ sung và/hoặc phần đưa vào một hoặc nhiều trong số các axit amin được chọn từ các gốc axit amin của các vị trí tương tác giữa protein PPO và thuốc diệt cỏ.

Biến thể protein PPO sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Một phương án đề xuất biến thể polypeptit chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 2 (CyPPO10) (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2), lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu (cụ thể, axit amin ở vị trí tương ứng của kiểu dại) hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Gốc axit amin của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2 được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu (cụ thể, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin được định vị ở vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2) có thể là một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm N59 (nghĩa là “N(Asn) ở vị trí 59”; sự biểu hiện của các gốc axit amin sau đây được hiểu theo cùng một cách), S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360, và I408 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án cụ thể, biến thể của polypeptit có thể chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360, và I408 có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), v.v. và khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng (ví dụ, được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), R(Arg), W(Trp), G(Gly) v.v. và khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng trong kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Ví dụ, biến thể của polypeptit có thể chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm F360M (nghĩa là “gốc axit amin ở vị trí 360 được thay thế từ F(Phe) thành M(Met)”); sự biểu hiện của các đột biến axit amin sau đây được hiểu theo cùng một cách), F360V, F360I, F360T, F360L, F360C, A167C, A167L, A167I, P303L, V305L, V305M, V305T, N59T, S60T, R89A, R89L, R89V, F161A, V165S, V165C, Q184G, F324V, L327T, I340T, I408R, và I408W, trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Cụ thể hơn, biến thể của polypeptit có thể chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm các đột biến axit amin của F360M, F360V, F360I, F360T, F360L, F360C, A167C, A167L, A167I, P303L, N59T, S60T, R89A, R89L, R89V, F161A, V165S, V165C, Q184G, V305L, V305M, V305T, F324V, L327T, I340T, I408R, I408W, P303L+V305L (nghĩa là thể đột biến hoặc đột biến chứa tất cả sự thay thế của gốc thứ 303 từ P thành L và sự thay thế của gốc thứ 305 từ V thành L; sự biểu hiện của hai hoặc nhiều hơn hai đột biến axit amin sau đây được hiểu theo cùng một cách), N59T+F360V, S60T+V165S+F360M, S60T+V165S+F360I, S60T+I340T+F360I, R89A+F360M, R89A+F360I, R89A+F360L, R89L+F360I, R89V+F360I, R89A+A167L+F360M, R89A+V305T+F360M, V165S+F360M, V165S+F360I, V165S+F360L, V165S+F360V, V165C+F360M, V165C+A167C+F360M, V165C+A167I+F360M, V165C+A167L+F360M, A167L+F360M, A167L+F360I, A167C+F360M, A167C+F360I, A167I+F360M, V305M+F360M, V305T+F360I, V305L+F360M, I408R+F360M, hoặc I408W+F360M, trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Phương án khác đề xuất biến thể polypeptit chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm các axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 4 (CyPPO13) (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4), lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng (cụ thể, axit amin ở vị trí tương ứng của kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Gốc axit amin của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 4 được xóa hoặc được

thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng (ví dụ, một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm axit amin được định vị ở vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 3) có thể là một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353, và F373, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo một phương án cụ thể, biến thể của polypeptit có thể chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin được chọn từ nhóm gồm R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353, và F373, có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 lần lượt và độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), v.v. và khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng trong kiểu đại (ví dụ, được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), E(Glu), Q(Gln), K(Lys), R(Arg), H(His), N(Asn), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng trong kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Ví dụ, biến thể của polypeptit có thể chứa, về cơ bản là gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm F373M, F373V, F373I, F373T, F373L, F373C, F373N, F373H, A177C, A177L, A177I, P316A, P316L, V318L, V318M, R101A, F171A, V175C, V175L, G194E, G194Q, G194M, G194K, G194R, F337V, L340T, và I353T, trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin này. Cụ thể hơn, biến thể của polypeptit có thể chứa trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm đột biến axit amin của F373M, F373V, F373I, F373T, F373L, F373C, F373N, F373H, A177C, A177L, A177I, P316A, P316L, V318L, V318M, R101A, F171A, V175C, V175L, G194E, G194Q, G194M, G194K, G194R, F337V, L340T, I353T, P316L+V318L, P316A+V318L, R101A+F373M,

A177C+F373M, A177I+F373M, A177L+F373M, A177L+F373I, A177L+F373L, A177L+F373T, A177L+F373V, A177C+F373T, A177C+F373V, V175L+F373M, G194E+F373M, G194Q+F373M, G194M+F373M, G194K+F373M, G194R+F373M, hoặc V318M+F373M, trong trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4 hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin nêu trên.

Biến thể polypeptit chứa trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự (ví dụ, độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn) được mô tả trong bản mô tả có thể duy trì hoạt tính enzym tương đương với hoạt tính của polypeptit có trình tự axit amin mà là tiêu chuẩn của việc xác định độ đồng nhất trình tự (ví dụ, protein PPO có đột biến axit amin được mô tả ở trên), ví dụ, hoạt tính enzym bằng 5% hoặc cao hơn, 10% hoặc cao hơn, 20% hoặc cao hơn, 30% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, 50% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, hoặc 95% hoặc cao hơn so với polypeptit có trình tự axit amin là tiêu chuẩn ở cây (trong toàn bộ cây, trong tế bào cây hoặc môi trường nuôi cấy tế bào, trong mô cây, v.v.), ở tảo, và/hoặc in vitro, và có chức năng để tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ. Phần mô tả độ đồng nhất trình tự được sử dụng để làm rõ rằng biến thể protein hoặc biến thể polypeptit PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả trong bản mô tả có thể chứa tất cả các trình tự đột biến trong phạm vi thỏa mãn điều kiện nêu trên (duy trì hoạt tính enzym và có chức năng tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ).

Tên của các axit amin được sử dụng trong phần mô tả được sắp xếp như sau:

Axit amin	Mã 3 chữ cái	Mã 1 chữ cái
Alanin	Ala	A
Isoleuxin	Ile	I
Leuxin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V
Aspargin	Asn	N
Xystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glyxin	Gly	G

Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
Axit aspartic	Asp	D
Axit glutamic	Glu	E
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K

Biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể duy trì hoạt tính enzym của protein PPO, và có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tăng cường so với kiểu dại.

Ngoài ra, biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể còn chứa đột biến có hoạt tính sinh học tương đương với polypeptit chứa SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 4, hoặc trình tự axit amin có đột biến axit amin được mô tả ở trên. Ví dụ, đột biến bổ sung có thể là sự thay thế axit amin mà không làm thay đổi toàn bộ hoạt tính phân tử, và sự thay thế axit amin này thường là đã biết trong lĩnh vực. Theo một ví dụ, sự thay thế bổ sung có thể là sự thay thế các gốc axit amin Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, hoặc Asp/Gly, nhưng không bị giới hạn ở đó. Trong một số trường hợp, biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể chịu cải biến bởi một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm phosphoryl hóa, sulfat hóa, axyl hóa, glycosyl hóa, methyl hóa, farnesyl hóa, v.v. Ngoài ra, biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể chứa biến thể protein trong đó độ ổn định cấu trúc đối với nhiệt, độ pH, v.v. của protein được tăng lên hoặc hoạt tính protein được tăng lên bởi đột biến và/hoặc cải biến axit amin.

Thuật ngữ “độ đồng nhất trình tự” dùng để chỉ mức độ tương tự so với kiểu dại hoặc trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit tham chiếu, và protein bất kỳ có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, miễn là nó bao gồm các gốc axit amin có độ đồng nhất bằng 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn so với trình tự axit amin của protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ và giữ hoạt tính sinh học tương đương với biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ. Các thể tương đồng protein này có thể chứa vị trí hoạt tính tương đương

với của protein đích. Việc so sánh độ đồng nhất có thể được thực hiện hoặc nhờ sự giúp đỡ của chương trình so sánh đã có sẵn. Độ đồng nhất giữa hai hoặc nhiều hơn hai trình tự có thể được tính theo phần trăm (%) sử dụng chương trình phân tích có sẵn trực tuyến. Việc sắp thẳng trình tự để so sánh trình tự có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ thông thường đã được biết trong lĩnh vực liên quan, và ví dụ, phương pháp thông thường có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở đó, GAP, BESTFIT, BLAST, và Clustal Omega.

Protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó có thể thu được bằng cách tách chiết từ tự nhiên và tinh sạch bằng phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực này. Nói cách khác, nó có thể thu được dưới dạng protein tái tổ hợp sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Trong trường hợp sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen, nó có thể thu được bằng quy trình thu gom protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó từ tế bào chủ, sau khi đưa axit nucleic mã hóa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó vào vector biểu hiện thích hợp, và biến nạp tế bào chủ với vector này để biểu hiện protein đích. Sau khi protein được biểu hiện trong tế bào chủ được chọn, các kỹ thuật tách hóa sinh thông thường, ví dụ, xử lý bằng chất làm kết tủa protein (kết tủa kiểu tạo muối), ly tâm, phá vỡ bằng siêu âm, siêu lọc, thẩm tách, sắc ký như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực và kỹ thuật tương tự có thể được sử dụng để phân lập và tinh sạch nó, và để tách protein có độ tinh khiết cao, các phương pháp này có thể được sử dụng kết hợp.

Phân tử axit nucleic PPO chống chịu thuốc diệt cỏ (polynucleotit mã hóa protein PPO hoặc biến thể của nó) có thể được phân lập hoặc chuẩn bị bằng cách sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn, ví dụ, phương pháp tổng hợp hóa học hoặc tái tổ hợp, hoặc kỹ thuật có bán trên thị trường có thể được sử dụng.

Theo phương án cụ thể, protein PPO được thấy là có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ rộng đối với 9 họ thuốc diệt cỏ ức chế PPO đại diện được phân loại theo cấu trúc hóa học của chúng trong hệ thống thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ sử dụng *E. coli* BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO). Cũng được thấy là chúng cũng có thể được biểu hiện trong lá lục của cây trồng bằng cách sử dụng peptit vận chuyển (TP). Ngoài ra, được thấy là protein PPO cũng có thể được biểu hiện ở *A. thaliana* kiểu sinh thái Columbia bởi vector biểu hiện ở cây trồng. Mặc dù cây trồng đã biến nạp được xử lý bằng thuốc diệt cỏ ức chế PPO, sự nảy mầm và sinh trưởng của cây trồng vẫn được quan

sát. Ngoài ra, sự di truyền của tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ ở trên đến thế hệ sau được xác nhận bằng nghiên cứu di truyền.

Do đó, protein PPO và biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả có thể được đưa vào cây trồng hoặc tảo, do đó được sử dụng để tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo.

Thuốc diệt cỏ trong bản mô tả dùng để chỉ thành phần hoạt tính giúp tiêu diệt, kiểm soát, hoặc nói cách khác là làm biến đổi bất lợi sự sinh trưởng của cây trồng hoặc tảo. Ngoài ra, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có nghĩa là ngay sau khi xử lý thuốc diệt cỏ thường tiêu diệt cây thông thường hoặc cây kiểu dại hoặc thường ức chế sự sinh trưởng của nó, việc ức chế sự sinh trưởng của cây bị làm yếu hoặc bị triệt tiêu, so với của cây thông thường hoặc cây kiểu dại, và do đó, cây tiếp tục sinh trưởng. Thuốc diệt cỏ bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO) của cây trồng hoặc tảo. Thuốc diệt cỏ ức chế PPO có thể được phân loại thành pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphtalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidindion, và các thuốc diệt cỏ khác theo cấu trúc hóa học của chúng.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ pyrimidindion bao gồm butafenaxil, saflufenaxil, benzfendizon, và tiafenaxil, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ diphenyl-ete bao gồm fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, axiflofen, bifenox, etoxyfen, lactofen, clometoxyfen, clorintrofen, floglycofen-etyl và halosafen, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ phenylpyrazol bao gồm pyraflufen-etyl và fluazolat, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ phenylphtalimit bao gồm flumioxazin, cinidon-etyl và flumiclorac-pentyl, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ phenyleste bao gồm phenopylat (2,4-diclophenyl 1-pyrrolidincarboxylat) và chất tương tự cacbamat của phenopylat (ví dụ, chất tương tự O-phenylpyrrolidino- và piperidinocacbamat (tham khảo "Ujjana B. Nandihalli, Mary V. Duke, Stephen O. Duke, Relationships between molecular properties and biological activities of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides., J. Agric. Food

Chem., 1992, 40(10):1993-2000”), v.v., nhưng không bị giới hạn ở đó. Theo một phương án, chất tương tự cacbamat của phenopylat có thể là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm phenyl este của axit pyrrolidin-1-carboxylic (CAS No. 55379-71-0), axit 1-pyrrolidincarboxylic, 2-clophenyl este (CAS No. 143121-06-6), 4-clophenyl pyrrolidin-1-carboxylat (CAS No. 1759-02-0), axit carbamic, dietyl-, 2,4-diclo-5-(2-propynyloxy)phenyl este (9CI) (CAS No. 143121-07-7), axit 1-pyrrolidincarboxylic, 2,4-diclo-5-hydroxyphenyl este (CAS No. 143121-08-8), 2,4-diclo-5-(metoxycacbonyl)phenyl pyrrolidin-1-carboxylat (CAS No. 133636-94-9), 2,4-diclo-5-[(propan-2-yloxy)cacbonyl]phenyl pyrrolidin-1-carboxylat (CAS No. 133636-96-1), axit 1-piperidincarboxylic, 2,4-diclo-5-(2-propynyloxy)phenyl este (CAS No. 87374-78-5), 2,4-diclo-5-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl pyrrolidin-1-carboxylat (CAS No. 87365-63-7), 2,4-diclo-5-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl 4,4-diflopiperidin-1-carboxylat (CAS No. 138926-22-4), 1-pyrrolidincarboxylicaxit, 3,3-diflo-, 2,4-diclo-5-(2-propyn-1-yloxy)phenyl este (CAS No. 143121-10-2), 4-clo-2-flo-5-[(propan-2-yloxy)cacbonyl]phenyl pyrrolidin-1-carboxylat (CAS No. 133636-98-3), v.v.

Thuốc diệt cỏ thiadiazol bao gồm fluthiaxet và thidiazimin, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ oxadiazol bao gồm oxadiargyl và oxadiazon, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ triazolinon bao gồm carfentrazon, sulfentrazon và azafenidin, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ oxazolidindion bao gồm pentoxazon, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ khác bao gồm pyraclonil, flufenpyr-etyl và proflumazoxon, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Gen PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được đề xuất trong bản mô tả có thể được đưa vào cây trồng hoặc tạo bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, và tốt hơn là, bằng cách sử dụng vector biểu hiện để biến nạp cây trồng hoặc tạo.

Trong trường hợp biến nạp cây trồng, gen khởi đầu thích hợp mà có thể được bao gồm trong vector có thể là gen khởi đầu bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực

để đưa gen vào cây trồng. Ví dụ, gen khởi đầu có thể bao gồm gen khởi đầu SP6, gen khởi đầu T7, gen khởi đầu T3, gen khởi đầu PM, gen khởi đầu ubiquitin ngô, gen khởi đầu 35S virus khảm cải hoa (CaMV), gen khởi đầu nopalín synthase (nos), gen khởi đầu 35S virus khảm huyền sâm, gen khởi đầu virus hình que ở cây mía, gen khởi đầu virus đốm vàng ở cây khoai tây, gen khởi đầu cảm ứng ánh sáng từ cấu trúc dưới phân tử nhỏ của ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (ssRuBisCO), gen khởi đầu triosephosphate isomerase (TPI) trong bào tương cây lúa, gen khởi đầu adenine phosphoribosyltransferase (APRT) của *Arabidopsis*, gen khởi đầu octopine synthase, và gen khởi đầu BCB (protein đồng liên kết màu xanh), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, vector có thể bao gồm trình tự tín hiệu poly A gây ra sự polyadenyl hóa của đầu tận cùng 3', và ví dụ, nó có thể bao gồm đầu 3' NOS thu được từ gen nopalín synthase của *Agrobacterium tumefaciens*, trình tự kết thúc octopine synthase thu được từ gen octopine synthase của *Agrobacterium tumefaciens*, đầu 3' của gen ức chế protease I hoặc II của cây cà chua hoặc cây khoai tây, trình tự kết thúc CaMV 35S, trình tự kết thúc α -amylase RAmy1 A ở cây lúa, và trình tự kết thúc phaseolin, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, gen khởi đầu đặc hiệu lặp lại, gen khởi đầu nhân, gen khởi đầu cấu trúc, hoặc gen khởi đầu cảm ứng có thể được sử dụng để đưa gen vào tạo làm gen khởi đầu. Gen PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả có thể được thiết kế để liên kết có điều khiển với 5' UTR hoặc 3' UTR, do đó biểu hiện chức năng ở nhân của tảo. Ngoài ra, vector còn có thể chứa trình tự điều hòa phiên mã thích hợp để biến nạp tảo. Gen tái tổ hợp tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được kết hợp vào hệ gen của nhân hoặc hệ gen của lặp lại trong tảo chủ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, trong vector, peptide vận chuyển cần để nhắm đích đến lặp lại có thể được liên kết với đầu 5' của gen PPO để biểu hiện gen PPO chống chịu thuốc diệt cỏ trong lặp lại.

Ngoài ra, một cách tùy ý, vector có thể còn bao gồm gen mã hóa trình tự đánh dấu chọn lọc làm phân tử chỉ thị, và ví dụ về trình tự đánh dấu chọn lọc này có thể bao gồm các chất kháng sinh (ví dụ, neomycin, carbenicillin, kanamycin, spectinomycin, hygromycin, bleomycin, chloramphenicol, v.v.) hoặc gen chống chịu thuốc diệt cỏ

(glyphosat, glufosinat, phosphinothricin, v.v.), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, vector tái tổ hợp để biểu hiện ở cây trồng có thể bao gồm vector hai thành phần *Agrobacterium*, vector đồng kết hợp, hoặc vector thông thường không có vùng T-ADN nhưng được thiết kế để được biểu hiện ở cây trồng. Trong số chúng, vector hai thành phần dùng để chỉ vector chứa hai hệ thống vector tách biệt chứa một plasmit chịu trách nhiệm phân tán gồm trình tự biên bên trái (LB) và trình tự biên bên phải (RB) trong plasmit Ti (cảm ứng khối u), và plasmit khác để chuyển gen đích, và vector có thể bao gồm vùng gen khởi đầu và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa để biểu hiện ở cây trồng.

Khi vector hai thành phần hoặc vector đồng kết hợp được sử dụng, chúng để biến nạp vector tái tổ hợp vào cây trồng tốt hơn là *Agrobacterium* (biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*). Về mặt này, *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *Agrobacterium rhizogenes* có thể được sử dụng. Ngoài ra, khi vector không có vùng T-ADN được sử dụng, phương pháp điện di, bắn hạt, hấp thụ qua trung gian polyetylen glycol, v.v. có thể được sử dụng để đưa plasmit tái tổ hợp vào cây trồng.

Cây trồng được biến nạp với gen bằng phương pháp ở trên có thể được biệt hóa lại thành cây thông qua sự cảm ứng thể sần, sự mọc rễ, và sự thích nghi đất sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Cây trồng được biến nạp trong bản mô tả được hiểu nghĩa là bao gồm tế bào cây (chứa tế bào được nuôi cấy trong huyền phù), tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi cũng như cây trồng trưởng thành.

Ngoài ra, phạm vi của thể biến nạp bao gồm thể biến nạp được đưa vào với gen cũng như dòng vô tính hoặc thế hệ con của nó (thế hệ T₁, thế hệ T₂, thế hệ T₃, thế hệ T₄, thế hệ T₅, hoặc các thế hệ tiếp theo bất kỳ). Ví dụ, cây trồng được biến nạp cũng bao gồm cây trồng có tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ được di truyền khi thế hệ con hữu tính và vô tính của cây trồng được biến nạp với gen được đề xuất trong bản mô tả. Phạm vi của sáng chế còn bao gồm tất cả các thể đột biến và biến thể thể hiện đặc điểm của cây trồng được biến nạp ban đầu, cùng với tất cả các thể lai và sản phẩm dung hợp của cây trồng được biến nạp với gen được đề xuất trong bản mô tả. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế còn bao gồm phần của cây, như hạt giống, hoa, thân, quả, lá, rễ, củ, và/hoặc rễ củ, được bắt nguồn từ cây trồng đã biến nạp được biến nạp trước bằng phương pháp theo sáng chế, hoặc thế hệ con của nó, và bao gồm ít nhất một phần các tế bào được biến

nap.

Cây trồng được áp dụng sáng chế là, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó, bao gồm cây trồng một lá mầm hoặc hai lá mầm. Ngoài ra, cây trồng bao gồm cây thân cỏ hoặc cây lấy gỗ. Cây một lá mầm có thể bao gồm cây trồng thuộc họ Alismataceae, Hydrocharitaceae, Juncaginaceae, Scheuchzeriaceae, Potamogetonaceae, Najadaceae, Zosteraceae, Liliaceae, Haemodoraceae, Agavaceae, Amaryllidaceae, Dioscoreaceae, Pontederiaceae, Iridaceae, Burmanniaceae, Juncaceae, Commelinaceae, Eriocaulaceae, Gramineae (Poaceae), Araceae, Lemnaceae, Sparganiaceae, Typhaceae, Cyperaceae, Musaceae, Zingiberaceae, Cannaceae, Orchidaceae, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Cây hai lá mầm có thể bao gồm cây trồng thuộc họ Diapensiaceae, Clethraceae, Pyrolaceae, Ericaceae, Myrsinaceae, Primulaceae, Plumbaginaceae, Ebenaceae, Styracaceae, Symplocaceae, Symplocaceae, Oleaceae, Loganiaceae, Gentianaceae, Menyanthaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Rubiaceae, Polemoniaceae, Convolvulaceae, Boraginaceae, Verbenaceae, Labiatae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Bignoniaceae, Acanthaceae, Pedaliaceae, Orobanchaceae, Gesneriaceae, Lentibulariaceae, Phrymaceae, Plantaginaceae, Caprifoliaceae, Adoxaceae, Valerianaceae, Dipsacaceae, Campanulaceae, Compositae, Myricaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Betulaceae, Fagaceae, Ulmaceae, Moraceae, Urticaceae, Santalaceae, Loranthaceae, Polygonaceae, Phytolaccaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae, Portulacaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Cactaceae, Magnoliaceae, Illiciaceae, Lauraceae, Cercidiphyllaceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Lardizabalaceae, Menispermaceae, Nymphaeaceae, Ceratophyllaceae, Cabombaceae, Saururaceae, Piperaceae, Chloranthaceae, Aristolochiaceae, Actinidiaceae, Theaceae, Guttiferae, Droseraceae, Papaveraceae, Capparidaceae, Cruciferae, Platanaceae, Hamamelidaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae, Eucommiaceae, Pittosporaceae, Rosaceae, Leguminosae, Oxalidaceae, Geraniaceae, Tropaeolaceae, Zygophyllaceae, Linaceae, Euphorbiaceae, Callitrichaceae, Rutaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Polygalaceae, Anacardiaceae, Aceraceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sabiaceae, Balsaminaceae, Aquifoliaceae, Celastraceae, Staphyleaceae, Buxaceae, Empetraceae, Rhamnaceae, Vitaceae, Elaeocarpaceae, Tiliaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Thymelaeaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Violaceae, Passifloraceae, Tamaricaceae, Elatinaceae, Begoniaceae, Cucurbitaceae, Lythraceae, Punicaceae,

Onagraceae, Haloragaceae, Alangiaceae, Cornaceae, Araliaceae, Umbelliferae (Apiaceae), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, cây trồng có thể là một hoặc nhiều cây được chọn từ nhóm gồm cây lương thực như cây lúa, cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây ngô, cây đậu tương, cây khoai tây, cây đậu đỏ, cây yến mạch, và cây lúa miến; cây rau như bắp cải Trung Quốc, củ cải, ớt đỏ, dâu tây, cà chua, dưa hấu, dưa chuột, bắp cải, dưa lê, bí ngô, hành hoa, củ hành, và cà rốt; các cây cho mục đích sử dụng cụ thể như cây nhân sâm, cây thuốc lá, cây bông, cỏ tươi, cỏ làm thức ăn cho gia súc, cây vừng, cây mía, củ cải đường, *Perilla* sp., cây lạc, cây cải dầu, cỏ, và dầu thầu dầu cây trồng; cây ăn quả như cây táo, cây lê, cây táo ta, cây đào, cây kiwi, cây nho, cây họ cam quýt, cây hồng vàng, cây mận, cây mơ và cây chuối; cây lấy gỗ như gỗ thông, dầu cọ, và bạch đàn; cây hoa như cây hoa hồng, hoa lay-on, cây đồng tiền, hoa cẩm chướng, cây hoa cúc, cây hoa ly và cây hoa tuy-lip; và cỏ khô làm thức ăn cho gia súc như rơm rạ, cỏ ba lá đỏ, cỏ nón cho mèo, cây linh lăng, cỏ roi và cỏ lòng lưu niên, nhưng không bị giới hạn ở. Theo phương án cụ thể, cây trồng có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm hai lá mầm cây trồng như *Arabidopsis thaliana*, cây khoai tây, cây cà tím, cây thuốc lá, ớt đỏ, cà chua, cây nguru bàng, cây tần ô, cây rau diếp, cây cát cánh, cây rau chân vịt, cây cải cầu vồng, cây khoai lang, cây cần tây, cà rốt, cần nước, mùi tây, bắp cải Trung Quốc, bắp cải, củ cải, dưa hấu, dưa lê, dưa chuột, bí ngô, cây bầu, dâu tây, cây đậu tương, cây đậu xanh, cây đậu tây, và cây đỗ; và cây một lá mầm như cây lúa, cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây ngô, cây lúa miến, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Tảo được áp dụng sáng chế là, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó, bao gồm tảo nhân sơ hoặc tảo nhân chuẩn. Ví dụ, tảo có thể là khuẩn lam, tảo xanh, tảo đỏ, tảo nâu, rong biển, hoặc vi tảo.

Khuẩn lam bao gồm *Chroococcales* phylum (ví dụ, *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chamaesiphon*, *Chondrocystis*, *Chroococcus*, *Chroogloeocystis*, *Crocospaera*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Cyanodictyon*, *Cyanosarcina*, *Cyanothece*, *Dactylococcopsis*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Halothece*, *Johannesbaptistia*, *Merismopedia*, *Microcystis*, *Radiocystis*, *Rhabdoderma*, *Snowella*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus*, *Woronichinia*), *Gloeobacteria* phylum, *Nostocales* phylum (ví dụ, *Microchaetaceae*, *Nostocaceae*, *Rivulariaceae*, *Scytonemataceae*), *Oscillatoriales* phylum (ví dụ, *Arthronema*, *Arthrospira*, *Blennothrix*,

Crinalium, Geitlerinema, Halomicronema, Halospirulina, Hydrocoleum, Jaaginema, Katagnymene, Komvophoron, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Phormidium, Planktothricoides, Planktothrix, Plectonema, Pseudanabaena, Pseudophormidium, Schizothrix, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema), Pleurocapsales phylum (ví dụ, Chroococcidiopsis, Dermocarpa, Dermocarpella, Myxosarcina, Pleurocapsa, Solentia, Stanieria, Xenococcus), Prochlorales phylum, hoặc Stigonematales phylum (ví dụ, Capsosira, Chlorogloeopsis, Fischerella, Hapalosiphon, Mastigocladopsis, Mastigocladus, Nostochopsis, Stigonema, Symphyonema, Symphonemopsis, Umezakia, Westiellopsis), v.v.

Làm ví dụ khác về tảo, Clophyta, Chlamydomonas, Volvaceales, Dunaliella, Scenedesmus, Chlorella, hoặc Hematococcm có thể được lấy làm ví dụ.

Làm ví dụ khác về tảo, Phaeodactylum tricornutum, Amphiprora hyaline, Amphora spp., Chaetoceros muelleri, Navicula saprophila, Nitzschia communis, Scenedesmus dimorphus, Scenedesmus obliquus, Tetraselmis suecica, Chlamydomonas reinhardtii, Chlorella vulgaris, Haematococcus pluvialis, Neochloris oleoabundans, Synechococcus elongatus, Botryococcus braunii, Gloeobacter violaceus, Synechocystis, Thermosynechococcus elongatus, Nannochloropsis oculata, Nannochloropsis salina, Nannochloropsis gaditana, Isochrysis galbana, Botryococcus sudeticus, Euglena gracilis, Neochloris oleoabundans, Nitzschia palea, Pleurochrysis carterae, Tetraselmis chuii, Pavlova spp., Aphanocapsa spp., Synechosystis spp., Nannochloris spp., v.v. có thể được lấy làm ví dụ. Tuy nhiên, tảo không bị giới hạn ở loại được nêu ở trên, và tảo thuộc các giống và họ khác nhau có thể được bao gồm.

Cây trồng hoặc tảo được đưa PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó vào được đề xuất trong bản mô tả có thể có khả năng chống chịu với hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ ức chế PPO.

Do đó, công nghệ được đề xuất trong bản mô tả có thể được sử dụng để kiểm soát cỏ dại hoặc loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai loại thuốc diệt cỏ ức chế PPO lần lượt hoặc đồng thời.

Một phương án đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt, bao gồm bước cung cấp cho đất trồng trọt cây trồng chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt

cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó được mô tả ở trên, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt.

Phương án khác đề xuất phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn ra khỏi môi trường nuôi trồng, bao gồm bước cung cấp tảo chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó được mô tả ở trên cho môi trường nuôi trồng, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

Ngoài ra, protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó được đề xuất trong bản mô tả có thể được sử dụng kết hợp với polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó.

Do đó, cây trồng hoặc tảo được đưa PPO chống chịu thuốc diệt cỏ vào được đề xuất trong bản mô tả có thể có khả năng chống chịu hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ khác nhau về cơ chế tác dụng. Theo sáng chế, hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ khác nhau bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế PPO, khác nhau về cơ chế tác dụng, có thể được sử dụng lần lượt hoặc đồng thời, do đó kiểm soát được cỏ dại và/hoặc loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn. Sau đây, thuốc diệt cỏ khác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO trong cơ chế ảnh hưởng được gọi là “thuốc diệt cỏ thứ hai”.

Một phương án đề xuất chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó; và polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó.

Phương án khác đề xuất thể biến nạp có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, hoặc dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó, chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó; và polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó.

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo ra cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, bao gồm bước biến nạp tảo hoặc tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây với protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó; và thuốc diệt cỏ thứ hai chống chịu polypeptit hoặc gen mã hóa nó.

Phương án khác đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt, bao gồm bước cung cấp cho đất trồng trọt cây trồng chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó; và polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt ức chế protoporphyrinogen oxidaza cỏ cho đất trồng trọt.

Phương án khác đề xuất phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn ra khỏi môi trường nuôi trồng, bao gồm bước cung cấp tảo chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa nó; và polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó cho môi trường nuôi trồng, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

Ví dụ, cây trồng hoặc tảo còn bao gồm polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa nó, do đó có khả năng chống chịu mới và/hoặc được tăng cường với thuốc diệt cỏ thứ hai.

Ví dụ, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế sự phân bào, thuốc diệt cỏ ức chế sự quang hợp, thuốc diệt cỏ ức chế sự tổng hợp axit amin, thuốc diệt cỏ ức chế plastit, thuốc diệt cỏ ức chế màng tế bào, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở. Thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi glyphosat, glufosinat, dicamba, 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic), thuốc diệt cỏ ức chế ALS (axetolactat synthaza) (ví dụ, imidazolidinon, sulfonylure, triazol pyrimidin, sulphonanilit, pyrimidin thiobenzoat, v.v.), thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II, thuốc diệt cỏ gốc phenylure, thuốc diệt cỏ ức chế plastit, thuốc diệt cỏ gốc bromoxynil, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ, polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ dưới dạng một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm EPSPS chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza chống chịu glyphosat), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza) hoặc glyphosat decarboxylaza chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat; PAT (phosphinothrixin-N-axetyltransferaza) chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat; DMO (dicamba monooxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba; 2,4-D monooxygenaza hoặc AAD (aryloxyalkanoat dioxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D; ALS (axetolactat Synthaza), AHAS

(axetohydroxyaxit synthaza), hoặc AtAHASL (Cấu trúc dưới phân tử lớn axetohydroxyaxit synthaza) chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS; protein D1 hệ quang hóa II chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; cytochrom P450 chống chịu thuốc diệt cỏ gốc phenylure; HPPD (hydroxylphenylpyruvat dioxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế plastit; nitrilaza chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, gen mã hóa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy làm ví dụ dưới dạng một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm gồm gen cp4 epsps, epsps (AG), mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 hoặc gat4621 chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat; gen bar, pat hoặc pat(SYN) chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat; gen dmo chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba; gen AAD-1 hoặc AAD-12 chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D; ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, SurA hoặc SurB chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS; gen psba chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II; gen CYP76B1 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure; gen HPPDPF W336 chống chịu thuốc diệt cỏ isoxaflutol; gen bxn chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở.

Hiệu quả có lợi

Biến thể của protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc gen mã hóa nó được đề xuất trong bản mô tả được áp dụng cho cây trồng hoặc tảo, do đó tạo ra và/hoặc tăng cường tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ tốt hơn, và việc kiểm soát chọn lọc được thực hiện sử dụng thuốc diệt cỏ, do đó kiểm soát cỏ dại hoặc loại bỏ sinh vật thủy sinh một cách kinh tế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là sơ đồ vectơ pACBB.

FIG. 2 thể hiện mức sinh trưởng tế bào sau khi xử lý tiafenaxil ở nồng độ 0 μ M (micromol), 100 μ M, hoặc 400 μ M, của BT3 *E. coli* thiếu hụt PPO lần lượt được biến nạp với mẫu đối chứng vectơ pACBB-eGFP (V), gen PPO1 của *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (AtPPO1 WT) dễ bị tác động bởi PPO, thể đột biến gen PPO1 của *A. thaliana* (AtPPO1 SLYM) chống chịu PPO, gen CyPPO10 (Cy10 WT), và gen CyPPO13 (Cy13 WT).

FIG. 3 là sơ đồ vector pET303-CT-His.

FIG. 4 thể hiện biểu đồ của vector tái tổ hợp đối với protein dung hợp trong đó MBP (maltoza liên kết protein) và protein PPO được dung hợp.

FIG. 5 là sơ đồ vector pMAL-c2X.

FIG. 6 là biểu đồ mẫu thể hiện cấu trúc của vector hai thành phần để biến nạp cây trồng của gen CyPPO.

FIG. 7 là kết quả của thẩm tách western thể hiện mức độ biểu hiện của protein biến thể CyPPO ở T₂ *A. thaliana* được biến nạp với gen biến thể CyPPO10 (biến thể F360I hoặc biến thể F360M) hoặc biến thể CyPPO13 (biến thể F373M).

FIG. 8 thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₃) được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO10 hoặc CyPPO13 khi được xử lý bằng 1 μ M tiafenaxil. Col-O có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 9 thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₂) được biến nạp với gen mã hóa biến thể CyPPO10 (F360C, F360I, F360L, F360M, F360V, F360T, A167C, A167L, A167L+F360M, hoặc A167C+F360I) khi được xử lý bằng tiafenaxil ở nồng độ 1 μ M, 5 μ M, hoặc 25 μ M.

FIG. 10 thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₂) được biến nạp với gen mã hóa biến thể CyPPO13 (A177C, F373C, F373I, F373M, A177L+F373L, hoặc A177L+F373I) khi được xử lý bằng tiafenaxil ở nồng độ 1 μ M hoặc 10 μ M.

FIG. 11 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 *E. coli* thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO10 (được chỉ định là Cy10 WT), hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng tiafenaxil lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, và 200 μ M.

FIG. 12 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng saflufenaxil lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, và 200 μ M.

FIG. 13 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng fomesafen lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và

200 μM .

FIG. 14 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng axifluorfen lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM và 200 μM .

FIG. 15 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng flumioxazin lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM và 200 μM .

FIG. 16 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng sulfentrazon lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM và 200 μM .

FIG. 17 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng pentoxazon lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM và 200 μM .

FIG. 18 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraflufen-ethyl lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM và 200 μM .

FIG. 19 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với Cy10 WT hoặc các gen đột biến CyPPO10 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraclostrobin lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM và 200 μM .

FIG. 20 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (ΔPPO) được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO13 (được chỉ định là Cy13 WT), hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng tiafenaxil lần lượt ở nồng độ 0 μM , 5 μM , 25 μM , và 50 μM .

FIG. 21 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO

(Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng saflufenaxil lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, và 50 μ M.

FIG. 22 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau khi được xử lý bằng fomesafen lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 23 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng axifluorfen lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 24 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng flumioxazin lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, và 50 μ M.

FIG. 25 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng sulfentrazon lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 26 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng pentoxazon lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 27 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraflufen-ethyl lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 28 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraclostrobin lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 29 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 thiếu hụt PPO

(Δ PPO) được biến nạp với Cy13 WT hoặc các gen đột biến CyPPO13 khác nhau, khi được xử lý bằng oxadiazon lần lượt ở nồng độ 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 30 là sơ đồ vectơ pET29b.

FIG. 31a đến 31c thể hiện kết quả nảy mầm hạt giống của thể biến nạp *A. thaliana* được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO10 hoặc CyPPO13 hoặc thể đột biến gen của nó, ở ngày thứ 7 sau khi gieo hạt trên môi trường 1/2 MS chứa các thuốc diệt cỏ khác nhau. Col-0 có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 32 thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₃) được biến nạp với gen mã hóa biến thể CyPPO10 (F360I, F360L, F360M, A167C+F360I, A167C+F360M, hoặc V305M+F360M) khi được xử lý bằng 25 μ M tiafenaxil hoặc 100 μ M saflufenaxil. Col-0 có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 33a thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₃) được biến nạp với gen mã hóa biến thể CyPPO10 (F360I hoặc A167L+F360M), khi được xử lý lần lượt bằng tiafenaxil, saflufenaxil, flumioxazin, hoặc sulfentrazon ở nồng độ 50 μ M.

FIG. 33b thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₃) được biến nạp với gen mã hóa biến thể CyPPO13 (A177L+F373L hoặc A177L+F373I) khi được xử lý lần lượt bằng saflufenaxil, tiafenaxil, flumioxazin, sulfentrazon, oxyfluorfen, hoặc pyraclostrobin ở nồng độ 50 μ M. Col-0 có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 34 thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₄) được biến nạp với CyPPO10 F360I khi được xử lý bằng 15 μ M tiafenaxil hoặc 150 μ M saflufenaxil.

FIG. 35 thể hiện mức độ tổn thương của thể biến nạp *A. thaliana* (T₅) được biến nạp với CyPPO10 F360I khi được xử lý bằng 15 μ M tiafenaxil hoặc 150 μ M saflufenaxil. Col-0 có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 36 là kết quả thấm tách western thể hiện mức độ biểu hiện của protein CyPPO10 F360I ở thể biến nạp *A. thaliana* (T₄ hoặc T₅) được biến nạp với CyPPO10 F360I.

FIG. 37 là sơ đồ vectơ hai thành phần pB2GW7.0.

FIG. 38 thể hiện mức độ tổn thương ở lá của cây đậu tương T₀ được biến nạp với gen đột biến CyPPO10 A167L+F360M khi được xử lý bằng 5 μ M hoặc 15 μ M

tiafenaxil. Cây đậu tương Kwangan có nghĩa là cây (cây trồng) đậu tương không chuyển gen.

FIG. 39 cung cấp kết quả thẩm tách southern thể hiện sự có mặt của gen chuyển trong cây đậu tương được biến nạp CyPPO10 A167L+F360M.

FIG. 40 thể hiện khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây đậu tương chuyển gen T1 (CyPPO10 A167L+F360M) 5 ngày sau khi xử lý phun tiafenaxil 25 μ M hoặc saflufenaxil 150 μ M. Cây đậu tương Kwangan có nghĩa là cây (cây trồng) đậu tương không chuyển gen.

FIG. 41 thể hiện mức sinh trưởng tế bào của BT3 (Δ PPO) *E. coli* được biến nạp với gen đột biến của CyPPO10 khi được nuôi cấy trong môi trường chứa thuốc diệt cỏ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không được dự định giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1. Phân lập gen PPO từ sinh vật nhân sơ

Gen PPO được gom lại sử dụng cơ sở dữ liệu Genbank của *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 và *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab, và gen PPO được tổng hợp bằng thông tin được tối ưu hóa codon để sàng lọc tính kháng thuốc diệt cỏ hiệu quả ở BT3 *E. coli*. Gen PPO đã tổng hợp được khuếch đại dưới các điều kiện sau đây sử dụng đoạn mồi nêu trong bảng 1 để tách dòng trên vectơ pACBB.

Năm mươi microlít (50 μ l) hỗn hợp phản ứng PCR được chuẩn bị bằng cách trộn 1 μ l khuôn (ADN tổng hợp của từng gen), 5 μ l 10X đệm, 1 μ l hỗn hợp dNTP (mỗi loại 10 mM), 1 μ l đoạn mồi xuôi (tham khảo bảng 1; 10 μ M), 1 μ l đoạn mồi ngược (tham khảo bảng 1; 10 μ M), 40 μ l DDW, và 1 μ l Pfu-X (Solgent, 2,5 đơn vị/ μ l), và sự khuếch đại được thực hiện dưới các điều kiện gồm 1 chu trình 94°C trong 4 phút, 25 chu trình gồm 94°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây và 72°C trong 1,5 phút, và 1 chu trình 72°C trong 5 phút.

PPO phân lập từ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 được chỉ định là CyPPO10, và PPO phân lập từ chủng *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab được chỉ định là CyPPO13, theo thứ tự.

Bảng 1

Chủng	Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	CyPPO10_BamHI F	CCCCGGATCCATGATTGAAGTGGATG TGGC	8
	CyPPO10_XhoI R	CCCCCTCGAGTGATTGTCCACCAGCG AGGT	9
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	CyPPO13_BamHI F	CCCCGGATCCATGAACCCTGCTACCC CTGA	10
	CyPPO13_XhoI R	CCCCCTCGAG CACCTGTGAT AACAACTGCT	11

Ví dụ 2. Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ bởi CyPPO10 và CyPPO13

Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ bởi CyPPO10 và CyPPO13 được kiểm tra sử dụng *E. coli* thiếu hụt PPO.

Sau khi biến nạp BT3 *E. coli* thiếu hụt PPO (Δ PPO) với CyPPO10 hoặc CyPPO13, BT3 được biến nạp (Δ PPO) được nuôi cấy trên đĩa thạch LB chứa thuốc diệt cỏ ức chế PPO để kiểm tra mức độ sinh trưởng của BT3 được biến nạp (Δ PPO). Chủng BT3 (Δ PPO) thu được từ trường Đại học Hokkaido (Nhật Bản). Chủng BT3 (Δ PPO) bị thiếu hụt PPO kiểu hemG và có khả năng chống chịu kanamycin (tham khảo "Watanabe et al., Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame inhibition codon, JBC 2001 276(23):20474–20481; Che et al., Molecular Characterization and Subcellular Localization of Protoporphyrinogen Oxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Physiol. 2000 Sep;124(1):59-70").

Quy trình thử nghiệm cụ thể là như sau:

Gen CyPPO10 và CyPPO13 được tách dòng trong vector pACBB (Plasmid #32551; Addgene; tham khảo FIG. 1).

Cụ thể là, các sản phẩm PCR được khuếch đại trong ví dụ 1 được xử lý bằng enzyme giới hạn BamHI và XhoI (New England Biolabs), và được nối bằng vector pACBB-eGFP mà được xử lý bằng cùng enzyme giới hạn.

Việc xử lý enzyme giới hạn được thực hiện ở các điều kiện sau đây:

30µl (microlít) sản phẩm PCR, 0,5µl BamHI và XhoI (New England Biolabs) theo thứ tự, 4µl 10X đệm, và 5,5µl nước; phản ứng enzym giới hạn 37°C, 1 giờ

Phản ứng nối được thực hiện ở các điều kiện sau đây:

0,5µl T4 ADN ligaza (RBC), 1µl đệm A, 1µl đệm B, sản phẩm PCR và vector được xử lý bằng enzym giới hạn, tổng 10µl; 22°C, 30 phút.

Plasmit đã tách dòng được bổ sung vào 100µl tế bào khả biến BT3 (trường Đại học Hokkaido; Japan) một cách tương ứng, nhờ đó biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt. *E. coli* được biến nạp với mỗi gen PPO được nuôi cấy trong môi trường thạch LB (Luria-Bertani) chứa Cloramphenicol (Duchefa).

Đối với môi trường nuôi cấy giống của *E. coli* đã được biến nạp với gen tương ứng, mỗi khuẩn lạc đơn của thể biến nạp *E. coli* như được đề xuất ở trên được nuôi cấy trong 3ml canh LB chứa cloramphenicol qua đêm (220 vòng/phút, 37°C), và 50 đến 100µl được cấy chuyển vào 3ml canh LB mới, và chúng được nuôi cấy cho tới khi độ hấp thụ (OD₆₀₀) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1, và chúng được pha loãng bằng canh LB đến độ hấp thụ (OD₆₀₀) bằng 0,5. Dung dịch đã pha loãng được pha loãng theo dãy 5 lần nữa theo hệ số một phần mười với canh LB. Sau đó, trên môi trường thạch LB (đĩa petri) chứa tiafenaxil ở nồng độ 0µM, 100µM, và 400µM, 10µl mỗi dung dịch đã pha loãng được thêm nhỏ giọt. Môi trường thạch LB được ủ ở 37°C, dưới điều kiện ánh sáng, và mức độ ức chế sự sinh trưởng được quan sát sau 16 đến 20 giờ ủ.

Để so sánh, cùng một thử nghiệm được thực hiện sử dụng thể biến nạp BT3 *E. coli* được biến nạp với vector pACBB-eGFP (Plasmit #32551; Addgene; tham khảo FIG. 1) (V; vector pACBB-eGFP); thể biến nạp BT3 *E. coli* được biến nạp với gen PPO1 *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) kiểu dại (AtPPO1 WT, AtPPO1 kiểu dại; dễ bị tác động bởi PPO) (SEQ ID NO: 6); và thể biến nạp BT3 *E. coli* được biến nạp với gen PPO1 đột biến của *A. thaliana* mã hóa các phần thể axit amin AtPPO1 đột biến (AtPPO1 SLYM, SEQ ID NO: 7) của Y426M (gốc axit amin thứ 426, tyrosin, được thế bằng methionin) và S305L (gốc axit amin thứ 305, serin, được thế bằng leuxin), trên cơ sở trình tự axit amin của AtPPO1 kiểu dại (SEQ ID NO: 5) (Li et al. Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize. Plant physiol. 2003 133:736-747).

Kết quả thu được được thể hiện trên FIG. 2. Như được thể hiện trên FIG. 2, trên

môi trường không chứa thuốc diệt cỏ (tiafenaxil 0 μM), sự sinh trưởng của thể biến nạp BT3 (V) được biến nạp với pACBB-eGFP trong đó gen PPO không được đưa vào không được phục hồi, và sự sinh trưởng của thể biến nạp BT3 được biến nạp với gen kiểu dại PPO1 *A. thaliana* dễ bị tác động bởi PPO (AtPPO1 WT), gen đột biến PPO1 *A. thaliana* chống chịu PPO (AtPPO1 SLYM), gen CyPPO10 (Cy10 WT), hoặc gen CyPPO13 (Cy13 WT) được khôi phục, khi mỗi gen được đưa vào có chức năng như enzym PPO trong BT3. Các kết quả này chứng minh rằng cả CyPPO10 và CyPPO13 đều gây ra chức năng PPO thông thường.

Thể biến nạp BT3 (AtPPO1 WT) được biến nạp với gen kiểu dại PPO1 *A. thaliana* dễ bị tác động bởi tiafenaxil, thường sinh trưởng trong môi trường không chứa thuốc diệt cỏ (0 μM), nhưng không sinh trưởng trong môi trường chứa 100 μM tiafenaxil. Thể biến nạp BT3 (AtPPO1 SLYM) được biến nạp với gen đột biến PPO1 *A. thaliana* mà chống chịu với tiafenaxil, bắt đầu có sự ức chế sinh trưởng từ 100 μM tiafenaxil và khó sinh trưởng ở 400 μM . Thể biến nạp BT3 được biến nạp với gen CyPPO10 hoặc CyPPO13 sinh trưởng trong môi trường chứa tiafenaxil 100 μM ở mức độ tương tự với của môi trường không chứa tiafenaxil, và cũng sinh trưởng tốt ngay cả trong môi trường chứa tiafenaxil 400 μM . Từ các kết quả này, được chứng minh rằng gen CyPPO10 và CyPPO13 có thể có khả năng chống chịu tiafenaxil cao hơn đáng kể so với kiểu dại PPO1 *A. thaliana* dễ bị tác động bởi tiafenaxil, và khả năng chống chịu tiafenaxil ở mức tương tự hoặc mức cao so với kiểu đột biến PPO1 *A. thaliana* có khả năng chống chịu tiafenaxil.

Ví dụ 3. Xác định các gốc axit amin PPO tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO từ phức hợp PPO và thuốc diệt cỏ ức chế PPO

Để nghiên cứu thông tin cấu trúc liên kết của protein PPO và thuốc diệt cỏ, tiafenaxil, saflufenaxil, flumioxazin, hoặc sulfentrazone được sử dụng để thử nghiệm làm ví dụ đại diện của thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Gen mã hóa protein CyPPO10 được tách dòng vào vector pET29b (Catalog Number: 69872-3; EMD Biosciences; tham khảo FIG. 30) và được biểu hiện dưới dạng protein CyPPO10 sử dụng hệ *E. coli*. Protein CyPPO10 đã biểu hiện được tinh sạch qua sắc ký ái lực niken, và được kết tinh với thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Sau đó, bằng cách sử dụng máy gia tốc bức xạ synchrotron, thu được dữ liệu nhiễu xạ tia X có độ phân giải 2,4Å của phức CyPPO10 và tiafenaxil, saflufenaxil, flumioxazin, hoặc sulfentrazone, để xác định cấu trúc ba chiều của phức này. Thông qua

quy trình này, thông tin về vị trí đột biến axit amin trong các protein CyPPO10 tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được thu thập.

Từ kết quả của việc phân tích cấu trúc phức CyPPO10 và tiafenaxil, được kết luận là axit amin của N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360, và I408 của protein CyPPO10 (SEQ ID NO: 2) được tương tác với tiafenaxil.

Sử dụng thông tin liên kết thu được từ cấu trúc của phức CyPPO10-tiafenaxil, các gốc axit amin tương tác với tiafenaxil trong protein CyPPO13 (SEQ ID NO: 4) được xác định bởi phép phân tích độ đồng nhất trình tự (NCBI BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) giữa các axit amin của CyPPO10 (SEQ ID NO: 2) và CyPPO13.

Kết quả là, được hiểu rằng axit amin của các vị trí R101, F171, V175, A177, G194, P316, V318, F337, L340, I353, và F373 của protein CyPPO13 (SEQ ID NO: 4) tương tác với tiafenaxil.

Ví dụ 4. Tạo ra biến thể PPO

Để tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của CyPPO10 và CyPPO13, cả hai gen đều được gây đột biến ở các vị trí axit amin tương tác với thuốc diệt cỏ, như được xác định trong ví dụ 3, nhờ đó tạo ra gen đột biến để tăng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO.

Gen PPO đột biến được phân lập và được khuếch đại bằng PCR ở các điều kiện sau đây sử dụng đoạn môi của bảng 3:

Vật liệu

Khuôn (ADN tổng hợp của CyPPO10 hoặc CyPPO13) 1µl

10X đệm 5 µl

Hỗn hợp dNTP (10mM mỗi hỗn hợp) 1µl

đoạn môi xuôi (10µM) 1µl

đoạn môi ngược (10µM) 1µl

DDW 40µl

Pfu-X (Solgent, 2,5 đơn vị/µl) 1µl

Tổng 50 μ l

Bảng 2

Điều kiện PCR

94°C	4 phút	
94°C	30 giây	25 chu trình
56°C	30 giây	
72°C	1,5 phút	
72°C	5 phút	
4°C	5 phút	

Bảng 3

Chủng	Đoạn mồi	Trình tự	SEQ ID NO:
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	CyPPO10_XbaI F	CCCCTCTAGAATGATTGAAGTGGA TGTGGC	12
	CyPPO10_XhoI R	CCCCCTCGAG TGATTGTCCA CCAGCGAGGT	13
<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	CyPPO13_XbaI F	CCC TCTAGAATG AAC CCT GCT ACC CCT GA	14
	CyPPO13_XhoI R	CCCCCTCGAG CACCTGTGAT AACAACTGCT	15

Sản phẩm gen được khuếch đại và vector pET303-CT His (VT0163; Novagen; tham khảo FIG. 3) được cắt bằng XbaI và XhoI, và sau đó, plasmit pET303-CyPPO10 và pET303-CyPPO13 được chuẩn bị tương ứng sử dụng T4 DNA ligaza (RBC, 3 đơn vị/ μ l).

Gen đột biến của CyPPO10 và CyPPO13 được chuẩn bị bằng cách thực hiện PCR ở các điều kiện sau sử dụng đoạn mồi được nêu trong bảng 5 và 6 dưới đây, và sử dụng CyPPO10 và CyPPO13 được tách dòng vào vector pET303-CT His làm khuôn.

Vật liệu

Khuôn 1 μ l

10X đệm 5 μ l

Hỗn hợp dNTP (10mM mỗi hỗn hợp) 1 μ l

đoạn mồi xuôi (10 μ M) 1 μ l

đoạn mồi ngược (10 μ M) 1 μ l

DDW 40 μ l

Pfu-X (Solgent, 2,5 đơn vị/ μ l) 1 μ l

Tổng 50 μ l

Bảng 4

Điều kiện PCR

94°C	4 phút	
94°C	30 giây	17~25 chu trình
56~60°C	30 giây	
72°C	3 phút	
72°C	5 phút	
4°C	5 phút	

Bảng 5

Danh sách đoạn mồi để tạo cấu trúc gen đột biến CyPPO13

Đột biến axit amin của CyPPO10	Trình tự đoạn mồi (5'→ 3')
F360M	F: GTT TTT ACC TCT ATG ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 16) R: AGC ACC TCC TAT CAT AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 17)
F360V	F: GTT TTT ACC TCT GTT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 18) R: AGC ACC TCC TAT AAC AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 19)
F360I	F: GTT TTT ACC TCT ATT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 20) R: AGC ACC TCC TAT AAT AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 21)
F360T	F: GTT TTT ACC TCT ACT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 22) R: AGC TCC ACC AAT AGT AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 23)

F360L	F: GTT TTT ACC TCT CTT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 24) R: AGC TCC ACC AAT AAG AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 25)
F360C	F: GTT TTT ACC TCT TGT ATA GGA GGT GCT ACT (SEQ ID NO: 26) R: AGC TCC ACC AAT ACA AGA GGT AAA AAC CTG (SEQ ID NO: 27)
A167C	F: TCAGGAGTGTAC TGT GGAGATCCTCAACAG (SEQ ID NO: 28) R: TTGAGGATCTCC ACA GTACACTCCTGAAAC (SEQ ID NO: 29)
A167L	F: TCAGGAGTGTAC CTT GGAGATCCTCAACAG (SEQ ID NO: 30) R: TTGAGGATCTCC AAG GTACACTCCTGAAAC (SEQ ID NO: 31)
P303L+ V305L	F: ATACCTTAT CTT ACT CTT GCT TGT GTT GTG (SEQ ID NO: 32) R: AACACAAGC AAG AGT AAG ATA AGG TAT (SEQ ID NO: 33)
V305M	F: CCTTATCCAACAT ATG GCTTGTGTTGTGCTT (SEQ ID NO: 34) R: CACAACACAAGC CAT AGTTGGATAAGGTAT (SEQ ID NO: 35)
N59T	F: GAG CTT GGT CCA ACT AGT TTC GCT C (SEQ ID NO: 36) R: AGCGAAACT AGT TGGACCAAGCTCCCA (SEQ ID NO: 37)
R89A	F: CAC CTT CCA GCT TAT ATA TAC TGG AGG GGA (SEQ ID NO: 38) R: GTA TAT ATA AGC TGG AAG GTG CCT ATC TCC (SEQ ID NO: 39)
V165S	F: GTT TCA GGA TCA TAC GCT GGA GAT CCT CAA CAG (SEQ ID NO: 40) R: TCC AGC GTA TGA TCC TGA AAC AAA TGG TGC CAC (SEQ ID NO: 41)
V305T	F: CCTTATCCAACAT ACT GCTTGTGTTGTGCTT (SEQ ID NO: 42) R: CACAACACAAGC AGT AGTTGGATAAGGTAT (SEQ ID NO: 43)
S60T	F: GGT CCA AAC ACT TTC GCT CCT ACT CCA GCA CTC (SEQ ID NO: 44) R: AGG AGC GAA AGT GTT TGG ACC AAG CTC CCA CAC (SEQ ID NO: 45)
I340T	F: CTC GGA ACC ACC TGG TCT TCA TGC TTA TTC CCA (SEQ ID NO: 46) R: TGA AGA CCA GGT GGT TCC GAG TGT CCT TAT ACC (SEQ ID NO: 47)
R89L	F: CAC CTT CCA CTT TAT ATA TAC TGG AGG GGA (SEQ ID NO: 48) R: GTA TAT ATA AAG TGG AAG GTG CCT ATC TCC (SEQ ID NO: 49)

R89V	F: CAC CTT CCA GTT TAT ATA TAC TGG AGG GGA (SEQ ID NO: 50) R: GTA TAT ATA AAC TGG AAG GTG CCT ATC TCC (SEQ ID NO: 51)
F161A	F: AGATTGGTGGCACCAGCAGTTTCAGGAGTGTAC (SEQ ID NO: 52) R: GTACACTCCTGAAACTGCTGGTGCCACCAATCT (SEQ ID NO: 53)
V165C	F: CCATTTGTTTCAGGA TGCTACGCTGGAGATCCT (SEQ ID NO: 54) R: AGGATCTCCAGCGTAGCATCCTGAAACAAATGG (SEQ ID NO: 55)
Q184G	F: TTTAGAAGGATTGCTGGACTTGAGAAGTTGGGA (SEQ ID NO: 56) R: TCCCAACTTCTCAAGTCCAGCAATCCTTCTAAA (SEQ ID NO: 57)
F324V	F: TCAGTTAGACCTGGAGTTGGTGTTTTGGTGCCT (SEQ ID NO: 58) R: AGGCACCAAAACACCAACTCCAGGTCTAACTGA (SEQ ID NO: 59)
L327T	F: CCTGGATTTGGTGTTACCGTGCCTAGAGGACAA (SEQ ID NO: 60) R: TTGTCCTCTAGGCACGGTAACACCAAATCCAGG (SEQ ID NO: 61)
A167I	F: TCAGGAGTGTACATTGGAGATCCTCAACAG (SEQ ID NO: 62) R: TTGAGGATCTCCAATGTACACTCCTGAAAC (SEQ ID NO: 63)
I408R	F: AGAAGGGCTCGTCCACAATATATCGTTGGTTAC (SEQ ID NO: 64) R: TATTGTGGACGAGCCCTTCTCCAAACCTTC (SEQ ID NO: 65)
I408W	F: GGTTTGGAGAAGGGCTTGGCCACAATATATCGTTGG (SEQ ID NO: 66) R: CCAACGATATATTGTGGCCAAGCCCTTCTCCAAACC (SEQ ID NO: 67)

Bảng 6

Danh sách đoạn mồi để tạo cấu trúc cho gen đột biến CyPPO13

Axit amin đột biến của CyPPO13	Trình tự đoạn mồi (5'→ 3')
F373M	F: TCATTTCTCAGT ATG TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 68) R: AGCACCTCCTAA CAT ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 69)
F373V	F: TCATTTCTCAGT GTT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 70)

	R: AGCACCTCCTAA AAC ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 71)
F373I	F: TCATTTCTCAGT ATT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 72) R: AGCACCTCCTAA AAT ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 73)
F373T	F: TCATTTCTCAGT ACT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 74) R: AGCACCTCCTAA AGT ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 75)
F373L	F: TCATTTCTCAGT CTT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 76) R: AGCACCTCCTAA AAG ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 77)
F373C	F: TCATTTCTCAGT TGT TTAGGAGGTGCTACA (SEQ ID NO: 78) R: AGCACCTCCTAA ACA ACTGAGAAATGAGTG (SEQ ID NO: 79)
R101A	F: AAGTTGCCAGCATATATCTACTGGGAGGGTGC (SEQ ID NO: 80) R: AGTAGATATATGCTGGCAACTTTGCATCAGCC (SEQ ID NO: 81)
A177C	F: TCA GGA GTT TAT TGT GGA GAT CCT GAT CAA (SEQ ID NO: 82) R: ATC AGG ATC TCC ACA ATA AAC TCC TGA TGT (SEQ ID NO: 83)
A177L	F: TCAGGAGTTTAT CTT GGAGATCCTGATCAA (SEQ ID NO: 84) R: ATCAGGATCTCC AAG ATAAACTCCTGATGT (SEQ ID NO: 85)
A177I	F: GGAGTTTATATTGGAGATCCTGATCAACTTAG (SEQ ID NO: 86) R: AGGATCTCCAATATAAACTCCTGATGTGAAAG (SEQ ID NO: 87)
P316L+ V318L	F: ATA CTC TAT CTT CCT CTT GCT GTT GTG GCT (SEQ ID NO: 88) R: CAC AAC AGC AAG AGG AAG ATA GAG TAT TTC (SEQ ID NO: 89)
V318L	F: TATCCACCTCTTGCTGTTGTGGCTCTTGCATAC (SEQ ID NO: 90) R: CAACAGCAAGAGGTGGATAGAGTATTCTGCC (SEQ ID NO: 91)
V318M	F: CTC TAT CCA CCT ATG GCT GTT GTG GCT CTT (SEQ ID NO: 92) R: AGC CAC AAC AGC CAT AGG TGG ATA GAG TAT (SEQ ID NO: 93)
P316A+ V318L	F: ATA CTC TAT GCT CCT CTT GCT GTT GTG GCT (SEQ ID NO: 94) R: CAC AAC AGC AGC AGG AAG ATA GAG TAT TTC (SEQ ID NO: 95)
F373N	F: TTTCTCAGTAACTTAGGAGGTGCTACAGATGC (SEQ ID NO: 96)

	R: CCTCCTAAGTTACTGAGAAATGAGTGATAAC (SEQ ID NO: 97)
F373H	F: TTTCTCAGTCACTTAGGAGGTGCTACAGATGC (SEQ ID NO: 98) R: CCTCCTAAGTGACTGAGAAATGAGTGATAAC (SEQ ID NO: 99)
G194Q	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTCAGCTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 100) R: CCGTATCTCTCTTCGAGCTGAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 101)
G194K	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTAAACTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 102) R: CCGTATCTCTCTTCGAGTTTAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 103)
G194R	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTCGTCTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 104) R: CCGTATCTCTCTTCGAGACGAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 105)
G194E	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTGAACTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 106) R: CCGTATCTCTCTTCGAGTTCAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 107)
G194M	F: GCTTTTCCTAGGGTGGCTATGCTCGAAGAGAGATACGG (SEQ ID NO: 108) R: CCGTATCTCTCTTCGAGCATAGCCACCCTAGGAAAAGC (SEQ ID NO: 109)
F337V	F: CAGCCATTAAGAGGAGTGGGTCATCTCATCCC (SEQ ID NO: 110) R: GGGATGAGATGACCCACTCCTCTTAATGGCTG (SEQ ID NO: 111)
L340T	F: GAGGATTTGGTCATACCATCCCTAGGTCTCAAG (SEQ ID NO: 112) R: CTTGAGACCTAGGGATGGTATGACCAAATCCTC (SEQ ID NO: 113)
I353T	F: GAACCTTGGGTACTACCTGGGCTTCATGTTTG (SEQ ID NO: 114) R: CAAACATGAAGCCCAGGTAGTACCCAAGGTTC (SEQ ID NO: 115)
F171A	F: AGATTGGTGGAGCCTGCTACATCAGGAGTTTAT (SEQ ID NO: 116) R: ATAAACTCCTGATGTAGCAGGCTCCACCAATCT (SEQ ID NO: 117)

R101A	F: GATGCAAAGTTGCCAGCTTATATCTACTGGGAG (SEQ ID NO: 118) R: CTCCCAGTAGATATAAGCTGGCAACTTTGCATC (SEQ ID NO: 119)
V175C	F: CCTTTCACATCAGGATGTTATGCTGGAGATCCT (SEQ ID NO: 120) R: AGGATCTCCAGCATAACATCCTGATGTGAAAGG (SEQ ID NO: 121)
V175L	F: ACATCAGGATTGTATGCTGGAGATCCTGATC (SEQ ID NO: 122) R: TCCAGCATACAATCCTGATGTGAAAGGCTCCAC (SEQ ID NO: 123)

Ví dụ 5. Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của PPO và biến thể của nó

Để tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của CyPPO10 và CyPPO13, axit amin tương tác với thuốc diệt cỏ, như được xác định trong Ví dụ 3, được gây đột biến. Sau khi BT3 *E. coli* (Δ PPO) thiếu hụt PPO được biến nạp với gen PPO có đột biến này, và sau đó được nuôi cấy với thuốc diệt cỏ ức chế PPO, để quan sát sự sinh trưởng của *E. coli* đã biến nạp, như sau:

Các plasmit pET303-CyPPO10 hoặc pET303-CyPPO13 tạo ra trong ví dụ 4, và plasmit chứa mỗi gen đột biến, được biến nạp vào tế bào khả biến BT3 bằng phương pháp sốc nhiệt, và được nuôi cấy trong môi trường thạch LB chứa ampicillin (100 μ g/ml).

Đối với môi trường nuôi cấy hạt của thể biến nạp BT3, khuẩn lạc đơn của nó được nuôi cấy trong 3ml canh LB (LPSS) chứa ampicillin trong 12 giờ hoặc lâu hơn, và 50~100 μ l dung dịch nuôi cấy được nuôi cấy thêm cho tới khi độ hấp thụ (OD_{600}) đạt đến khoảng từ 0,5 đến 1. Sau đó, dung dịch nuôi cấy thu được được pha loãng bằng canh LB để điều chỉnh độ hấp thụ (OD_{600}) đến 0,5, và được pha loãng 5 lần nữa theo hệ số một phần mười bằng canh LB.

LB (25 g/L), thạch Bacto (12 g/L), ampicillin (100 μ g/ml) và các thuốc diệt cỏ khác nhau (0~200 μ M) được trộn, để tạo ra môi trường chứa thuốc diệt cỏ.

Mười microlít dung dịch đã pha loãng được nhỏ giọt vào môi trường chứa thuốc diệt cỏ, và môi trường này được ủ có ánh sáng trong thời gian 16-20 giờ ở nhiệt độ 37°C. Mức sinh trưởng và khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của BT3 được biến nạp với mỗi gen được đánh giá.

Thuốc diệt cỏ được sử dụng trong thử nghiệm được nêu trong bảng 7 sau đây:

Bảng 7

Họ	Thuốc diệt cỏ
Thuốc diệt cỏ gốc pyrimidindion	Tiafenaxil
	Saflufenaxil
Thuốc diệt cỏ gốc diphenyl ete	Fomesafen
	Axifluorfen
Thuốc diệt cỏ gốc N-phenylphthalimit	Flumioxazin
Thuốc diệt cỏ gốc triazolinon	Sulfentrazon
Thuốc diệt cỏ gốc oxazolidinedion	Pentoxazon
Thuốc diệt cỏ gốc phenylpyrazol	Pyraflufen-etyl
Các thuốc diệt cỏ khác	Pyraclonil

Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được đánh giá tương đối so với kiểu đại CyPPO, và được thể hiện trong bảng 8 đến 11 sau đây và FIG. 11 đến 29:

Bảng 8

Đột biến CyPPO10	Tiafenaxil (lên đến 200 μ M)	Saflufenaxil (lên đến 200 μ M)	Axifluorfen (lên đến 200 μ M)	Fomesafen (lên đến 200 μ M)
CyPPO10 (kiểu đại)	-	-	-	-
F360C	++++	++++	++++	++++
F360I	++++	++++	++++	++++
F360L	++++	++++	++++	++++
F360M	++++	++++	++++	++++
F360V	++++	++++	++++	++++
A167C	+++	+	++++	++++
A167L	++++	+++	++++	++++

P303L+V305L	NT	NT	++	+
V305M	++	+	+++	++++

NT (không được kiểm tra)

Bảng 9

Đột biến CyPPO10	Pentoxazon (lên đến 200 μ M)	Pyraflufen-ethyl (lên đến 200 μ M)	Pyraclonil (lên đến 200 μ M)	Flumioxazin (lên đến 200 μ M)	Sulfentrazon (lên đến 200 μ M)
CyPPO10 (kiểu đại)	-	-	-	-	-
F360C	++++	++++	++++	++++	++++
F360I	++++	++++	++++	++++	++++
F360L	++++	++++	++++	++++	++++
F360M	++++	++++	++++	++++	++++
F360V	++++	++++	++++	NT	++++
A167C	++++	++++	++++	+	++
A167L	++++	++++	++++	++++	+++
P303L+V305 L	++++	+	+++	NT	NT
V305M	++++	+	+++	NT	NT

NT (không được kiểm tra)

Bảng 10

Đột biến CyPPO13	Tiafenaxil (lên đến 50 μ M)	Saflufenaxil (lên đến 50 μ M)	Axifluorfen (lên đến 200 μ M)	Fomesafen (lên đến 200 μ M)	Pentoxazon (lên đến 200 μ M)
CyPPO13 (kiểu đại)	-	-	-	-	-
F373C	+++++	+++	+++	+++	++++
F373I	+++++	+++++	+++	+++	+++++
F373L	+++++	+++++	+++	++++	+++++
F373M	+++++	+++	+++	++++	+++++
F373T	+++++	++++	++++	++++	++++

A177C	NT	+	++++	++++	++++
A177L	++	+	++++	++++	++++
V318M	NT	NT	+++	++	+
P316A+V318L	NT	NT	+++	-	NT
P316L+V318L	NT	NT	+++	++	NT

NT (không được kiểm tra)

Bảng 11

Đột biến CyPPO13	Pyraflufen-ethyl (lên đến 200 μ M)	Pyraclonil (lên đến 200 μ M)	Sulfentrazon (lên đến 200 μ M)	Flumioxazin (lên đến 50 μ M)
CyPPO13	-	-	-	-
F373C	++	+++++	-	-
F373I	++	+++++	++++	++++
F373L	++	+++++	++++	++++
F373M	++	+++++	++++	+++
F373T	++++	++++	+	++++
A177C	+++++	++++	++++	-
A177L	+++++	+++	++++	++++
V318M	++	-	+	NT
P316A+V318L	+	-	-	NT
P316L+V318L	+	-	+	NT

NT (không được kiểm tra)

Trong các bảng 8 đến 11, mức độ chống chịu thuốc diệt cỏ của kiểu đại được thể hiện bằng dấu "-", và mức độ chống chịu thuốc diệt cỏ được phân cấp bằng cách biểu diễn mức độ chống chịu tương đương bằng dấu "-", và nếu cao hơn, thêm dấu "+" đến tối đa là "+++++".

FIG. 11 đến 19 (kiểu đại và biến thể của CyPPO10) và FIG. 20 đến 29 (kiểu đại và biến thể của CyPPO13) thể hiện kết quả của việc nuôi cấy *E. coli* được biến nạp với gen CyPPO (kiểu đại và kiểu biến thể), và nồng độ được mô tả ở phần phía trên là nồng độ của thuốc diệt cỏ được xử lý. Sáu cột của mỗi nồng độ được pha loãng liên tiếp 5 lần

theo hệ số một phần mười bằng dung dịch môi trường nuôi cấy *E. coli* sang bên phải, và cột ngoài cùng bên trái là kết quả của dung dịch nuôi cấy *E. coli* OD₆₀₀=0,5.

Như được thể hiện trong bảng 8 đến 11 và trên FIG. 11 đến 29, được chứng minh là tất cả các thể biến nạp được biến nạp với gen đột biến của CyPPO10 và CyPPO13 có mức độ chống chịu thuốc diệt cỏ bằng nhau hoặc được tăng lên đối với các loại thuốc diệt cỏ khác nhau, so với thể biến nạp có gen kiểu dại.

Ví dụ 6: Đo hoạt tính enzym và giá trị IC₅₀ bằng thuốc diệt cỏ của PPO

Hoạt tính enzym của protein PPO và biến thể protein PPO được kiểm tra, và thử nghiệm ức chế bởi thuốc diệt cỏ ức chế PPO được thực hiện. Được xác nhận là protein PPO có độ tan trong nước thấp, nhưng trong trường hợp được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp với MBP (protein liên kết maltoza) (MBP-PPO), protein PPO có thể được biểu hiện ổn định ở dạng tan trong nước. Do đó, protein kiểu dại và protein biến thể được biểu hiện ở dạng protein dung hợp với MBP được sử dụng trong thử nghiệm này (tham khảo FIG. 4).

Để biểu hiện gen kiểu dại và gen đột biến của CyPPO10 và CyPPO13 (tham khảo Ví dụ 1 và Ví dụ 4), các gen này được đưa vào vectơ pMAL-c2X (tham khảo FIG. 5) tương ứng, và sau đó được tách dòng vào BL21 (DE3) *E. coli* (CodonPlus).

E. coli đã biến nạp được nuôi cấy ở các điều kiện sau đây để biểu hiện gen PPO đã đưa vào:

Cảm ứng: OD₆₀₀=0,2, bổ sung IPTG đến nồng độ cuối 0,3mM;

Nhiệt độ biểu hiện: 23°C, nuôi cấy lắc 200 vòng/phút;

Thời gian biểu hiện: 16 giờ;

Quy mô nuôi cấy: 200ml/bình tam giác 1000ml.

Sự phân giải tế bào và chiết protein được thực hiện bằng quy trình sau đây đối với các tế bào *E. coli* được nuôi cấy:

Đệm chiết: đệm cột (Tris-Cl 50mM, pH=8,0, NaCl 200mM) 5ml đệm/g tế bào;

Nghiền bằng sóng âm: SONICS&MATERIALS VCX130 (130 óát);

15 giây BẬT, 10 giây TẮT trong 5 phút trên đá lạnh;

Ly tâm dưới điều kiện 4°C trong 20 phút (20.000 x g); và chất nổi bề mặt thu được bằng ly tâm được pha loãng ở tỷ lệ 1:6 sử dụng đệm cột.

Quy trình tinh sạch protein PPO sau đây được thực hiện trong phòng lạnh 4°C. Nhựa amyloza (New England Biolabs) được nhồi vào cột 1,5x15 cm (Cột Bio-Rad Econo 1,5 x 10 cm, sắc ký cột thủy tinh, thể tích tối đa), và sản phẩm chiết protein thu được được tải lên cột ở tốc độ dòng 0,2 ml/phút. Cột được rửa bằng 3 thể tích cột đệm, và lượng protein trong dung dịch rửa được kiểm tra. Khi protein không còn được phát hiện thấy, việc rửa kết thúc. Sau đó, protein MBP-PPO được giải hấp với khoảng 2 thể tích cột của đệm chứa maltoza 20mM. Nồng độ protein của mỗi chất rửa giải được xác định và việc giải hấp được dừng lại khi protein không còn được phát hiện thấy. Mười microlít của mỗi phân đoạn được kiểm tra để định lượng protein và phân tích SDS-PAGE. Phân đoạn tinh khiết ở mức độ cao với protein PPO được lấy cho thử nghiệm hoạt tính enzym.

Hoạt tính enzym của protein kiểu đại được tinh sạch và protein biến thể của CyPPO10 và CyPPO13 được đo bằng quy trình sau đây.

Trước tiên, cơ chất của protein PPO, Protoporphyrinogen IX được tổng hợp. Quy trình này được thực hiện trong khoảng không gian trong đó khí nitơ được tạo thành dòng. 6mg protoporphyrin IX được hòa tan trong 20% (v/v) EtOH 20ml, và được khuấy ở điều kiện bóng tối trong 30 phút. Dung dịch protoporphyrinogen IX thu được được đặt vào ống có vít 15ml ở lượng 800µl, và được phun khí nitơ trong 5 phút. Thêm 1g hỗn hợp natri vào ống này và thực hiện lắc mạnh trong 2 phút. Nắp được mở để xả hết khí hydro trong ống. Sau đó, đóng nắp và ủ trong 3 phút. Dung dịch protoporphyrin IX được lọc sử dụng ống bơm và bộ lọc màng xenluloza. Thêm MOPS [axit 3-(N-morpholino)propanesulfonic] 2M ở lượng khoảng 300µl vào 600µl dung dịch protoporphyrin IX thu được, nhờ đó điều chỉnh độ pH đến 8,0. Để xác định hoạt tính enzym của protein PPO, hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị với hợp phần sau đây (trên cơ sở 10ml): Tris-Cl 50mM (pH=8,0); NaCl 50mM; Tween 20 0,04% (v/v); glucoza 40mM (0,072 g); 5 đơn vị glucoza oxidaza (16,6mg); và 10 đơn vị catalaza (1µl).

Hai trăm microlít (200µl) hỗn hợp phản ứng chứa protein PPO được tinh sạch được đặt vào đĩa 96 lỗ, và được ủ sơ bộ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng để giảm nồng độ oxy bởi phản ứng của glucoza oxidaza-catalaza. Dầu khoáng được phân lớp và

sau đó phản ứng được bắt đầu bằng cách bổ sung cơ chất, dung dịch protoporphyrin IX, đến nồng độ cuối là 50 μ M. Phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút và sự phát huỳnh quang của protoporphyrin IX được đo sử dụng đầu đọc vi đĩa (Sense, Hidex) (bước sóng kích thích: 405nm; bước sóng phát: 633nm). Để tính toán hoạt tính enzym PPO, dung dịch protoporphyrinogen IX được giữ hờ trong không khí để oxy hóa dung dịch (qua đêm). Thêm HCl 2,7N vào dung dịch này, và độ hấp thụ ở 408nm được đo. Đường cong chuẩn được tạo ra sử dụng protoporphyrin IX chuẩn, và hoạt tính PPO được đo bằng cách hiệu chỉnh protoporphyrin IX sử dụng đường cong chuẩn của protoporphyrin IX.

Hoạt tính enzym của kiểu đại PPO thu được và biến thể được thể hiện trong bảng 12.

Trong khi đó, các giá trị hằng số Michaelis-Menten (K_m) và vận tốc tối đa (V_{max}) của mỗi enzym được tính để đánh giá thông số động học của protein PPO (CyPPO10 và CyPPO13). Vận tốc phản ứng ban đầu được đo trong đó vận tốc phản ứng tỷ lệ với nồng độ cơ chất, và lượng protoporphyrin IX được đề xuất là sản phẩm phản ứng enzym được đo bằng khoảng thời gian ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút. Các giá trị K_m và V_{max} được tính bằng chương trình phân tích động học enzym nhờ phương trình Michaelis-Menten, và PPO của cây trồng được sử dụng làm nhóm đối chứng. Kết quả thu được được thể hiện trong bảng 12:

Bảng 12

Phân loại	CyPPO10	CyPPO13	AtPPO1	<i>Amaranthus</i> PPO1
V_{max} (μ M mg protein ⁻¹ phút ⁻¹)	949,1 $\pm$ 64	341,4 $\pm$ 14	134,4 $\pm$ 19	57 $\pm$ 7

Như được thể hiện trong bảng 12, CyPPO10 và CyPPO13 có khả năng tốt hơn dưới dạng enzym PPO so với *A. thaliana* PPO1 (AtPPO1) và *Amaranthus* PPO1.

Nồng độ của thuốc diệt cỏ ức chế PPO mà ức chế hoạt tính enzym PPO đến 50% (IC_{50}) được đo cho mỗi thuốc diệt cỏ. Nồng độ cuối của mỗi thuốc diệt cỏ là như sau:

0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 nM

Giá trị IC_{50} được tính là nồng độ của thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính enzym PPO

đến 50% trước khi thêm thuốc diệt cỏ ở nồng độ nêu trên vào quy trình đo hoạt tính enzym nêu trên.

Giá trị IC_{50} của các thuốc diệt cỏ khác nhau được thể hiện trong bảng 13 sau đây.

Bảng 13

CyPP O10 Số	Đột biến	Hoạt tính (%)	$IC_{50}(nM)$					
			Tiafenaxil	Saflufenaxil	Fomesafen	Butafenaxil	Flumioxazin	Sulfentrazone
1	WT	100	21	9	15	8	NT	NT
2	F360M	93	115	1500	114	24	NT	NT
3	F360I	67	799	3916	191	268	3323	NT
4	F360L	59	172	NT	NT	NT	NT	NT
5	F360V	56	307	NT	NT	NT	NT	NT
6	N59T + F360V	62	543	NT	NT	NT	NT	NT
7	R89A + F360M	67	931	5000	5000	674	1216	5000
8	R89A + F360I	38	2,153	5000	5000	1,323	5000	5000
9	R89A + F360L	30	1,000	NT	NT	NT	1,025	NT
10	V165S + F360M	78	435	NT	NT	NT	119	NT
11	V165S + F360I	63	818	NT	NT	NT	NT	NT
12	V165S + F360L	59	470	NT	NT	NT	NT	NT
13	V165S + F360V	52	929	NT	NT	NT	NT	NT
14	A167L + F360M	80	5000	5000	3000	4000	5000	5000
15	A167L + F360I	32	5000	NT	NT	NT	NT	NT
16	A167C + F360M	90	4500	5000	1900	2500	4000	5000

17	A167C + F360I	48	4500	NT	NT	NT	NT	NT
18	V305M + F360M	87	356	5000	675	121	544	2057
19	V305T + F360I	10	276	NT	NT	NT	NT	NT
20	R89A + V305T + F360M	5	741	NT	NT	NT	NT	NT
21	S60T + V165S + F360M	17	2720	NT	NT	NT	NT	NT
22	S60T + V165S + F360I	12	3580	NT	NT	NT	NT	NT
23	S60T + I340T + F360I	5	2000	NT	NT	NT	NT	NT
24	R89V + F360I	57	242	NT	NT	NT	NT	NT
25	R89L + F360I	51	184	NT	NT	NT	NT	NT
26	A167I + F360M	85	5000	5000	5000	5000	5000	5000
27	V165C + F360M	93	2169	NT	NT	NT	NT	NT
28	V305L + F360M	82	262	NT	NT	NT	NT	NT
29	V165C + A167C + F360M	91	5000	5000	3034	2810	5000	5000
30	V165C + A167I + F360M	75	5000	5000	3741	5000	5000	5000
31	V165C +	83	5000	5000	4277	4820	5000	5000

	A167L + F360M							
32	R89A + A167L + F360M	7	5000	NT	NT	NT	NT	NT
33	I408R + F360M	5	5000	NT	NT	NT	NT	NT
34	I408W + F360M	5	5000	NT	NT	NT	NT	NT
35	R89A	83	104	NT	NT	NT	NT	NT
36	F161A	92	203	NT	NT	NT	NT	NT
37	V165C	99	97	NT	NT	NT	NT	NT
38	A167C	98	86	NT	NT	NT	NT	NT
39	A167L	95	792	NT	NT	NT	NT	NT
40	Q184G	97	79	NT	NT	NT	NT	NT
41	V305M	100	186	NT	NT	NT	NT	NT
42	F324V	59	140	NT	NT	NT	NT	NT
43	L327T	84	214	NT	NT	NT	NT	NT
44	I340T	19	216	NT	NT	NT	NT	NT
45	F360T	85	5000	NT	NT	NT	NT	NT
CyPP O13								
1	WT	100	28	36	30	37	NT	NT
2	F373M	98	56	481	77	18	NT	NT
3	F373I	83	135	1480	NT	NT	NT	NT
4	F373L	82	141	1470	NT	NT	NT	NT
5	F373C	86	212	NT	NT	NT	NT	NT
6	F373V	83	339	NT	NT	NT	NT	NT
7	F373T	81	818	NT	NT	NT	NT	NT
8	F373H	26	114	NT	NT	NT	NT	NT
9	F373N	40	40	NT	NT	NT	NT	NT
10	R101A + F373M	55	615	5000	NT	NT	573	NT

11	A177C + F373M	77	336	4500	NT	NT	NT	NT
12	A177I+ F373M	75	261	4700	NT	NT	NT	NT
13	A177L + F373M	75	1122	5000	690	2500	5000	5000
14	A177L + F373I	66	1630	5000	315	5000	5000	5000
15	A177L + F373L	68	5000	5000	464	5000	5000	5000
16	V175L + F373M	93	203	1375	NT	NT	NT	NT
17	V318M + F373M	72	386	1924	NT	NT	NT	NT
18	A177L + F373T	62	4700	5000	3000	4000	5000	5000
19	A177L + F373V	49	5000	5000	1229	5000	5000	5000
20	A177C + F373T	80	3900	NT	NT	NT	NT	NT
21	A177C + F373V	56	3200	NT	NT	NT	NT	NT
22	G194E + F373M	32	64	261	NT	NT	66	NT
23	G194Q + F373M	37	24	265	NT	NT	5.2	NT
24	G194M + F373M	43	20	475	NT	NT	53	NT
25	G194K + F373M	41	95	224	NT	NT	128	NT
26	G194R + F373M	35	67	218	NT	NT	81	NT
27	R101A	87	139	NT	NT	NT	NT	NT

28	F171A	70	70	NT	NT	NT	NT	NT
29	V175C	94	57	NT	NT	NT	NT	NT
30	A177C	98	113	NT	NT	NT	NT	NT
31	A177L	97	211	NT	NT	NT	NT	NT
32	V318M	81	211	NT	NT	NT	NT	NT
33	F337V	88	158	NT	NT	NT	NT	NT
34	L340T	83	443	NT	NT	NT	NT	NT
35	I353T	62	280	NT	NT	NT	NT	NT

NT (không được kiểm tra)

Như được thể hiện trong bảng 13, biến thể protein CyPPO có giá trị IC_{50} được tăng nhiều hơn, so với protein CyPPO kiểu dại. Các kết quả này chứng minh rằng các đột biến axit amin ở vị trí nhất định của protein PPO có thể dẫn đến làm tăng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ. Mặc dù các dữ liệu này cho chỉ ra rằng biến thể protein CyPPO có hoạt tính enzym giảm so với kiểu dại, có thể là do các điều kiện tạo nếp gấp protein khác nhau, và/hoặc tính kỵ nước của PPO tái tổ hợp so với PPO tự nhiên. Trong khi các PPO tự nhiên kỵ nước và định vị ở màng của lục lạp trong cây trồng, các PPO tái tổ hợp được tạo ra trong *E.coli* là ưa nước chứa MBP làm đối tác dung hợp. Do đó, khi biến thể PPO được kết hợp thích hợp và định vị trong màng lục lạp của cây trồng, hoạt tính enzym sẽ không bị ảnh hưởng lớn.

Ví dụ 7. Tạo thể biến nạp *A. thaliana* bằng cách sử dụng CyPPO và biến thể của nó và thử nghiệm chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO

7-1. Tạo cấu trúc vector biến nạp *A. thaliana* và biến nạp *A. thaliana*

A. thaliana được biến nạp với vector hai thành phần có ORF của trình tự đánh dấu chọn lọc, gen bar (chống chịu glufosinat), và của mỗi gen mã hóa của CyPPO10 hoặc biến thể CyPPO13. Cây trồng chuyển gen được kiểm tra khả năng chống chịu chéo đối với glufosinat và thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Gen bar cũng được sử dụng để kiểm tra xem liệu gen chuyển có được di truyền ổn định qua các thế hệ không. Gen khởi đầu NOS và trình tự kết thúc E9 được sử dụng để biểu hiện gen bar.

Để biểu hiện CyPPO10, biến thể CyPPO10, CyPPO13 và biến thể CyPPO13, tương ứng ở cây trồng, gen khởi đầu CaMV35S và trình tự kết thúc NOS được sử dụng. Gen mã hóa của CyPPO10, biến thể CyPPO10, CyPPO13 và biến thể CyPPO13 được

tách dòng sử dụng enzym giới hạn XhoI và BamHI. Để xác định protein biểu hiện, thể hemagglutinin (HA) được dung hợp với vùng đầu tận cùng 3' sử dụng enzym giới hạn BamHI và SacI. Trình tự kết thúc NOS được chèn vào sau thể HA, nhờ đó kết thúc quá trình phiên mã của gen PPO. Ngoài ra, để vận chuyển protein đến lục lạp, peptit vận chuyển (TP) của gen AtPPO1 (SEQ ID NO: 10) được chèn vào trước đầu 5' của gen đã chèn sử dụng enzym giới hạn XbaI và XhoI. Vùng peptit vận chuyển được chèn vào vector được thể hiện bởi SEQ ID NO: 27 và trình tự thể HA đã chèn được thể hiện bởi SEQ ID NO: 28. Biểu đồ biến nạp cây trồng với vector hai thành phần được thể hiện trên FIG. 6.

Mỗi vector được tạo cấu trúc ở trên được đưa vào tế bào khả biến GV3101 của *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp kết cặp đông-rã đông. Để chuẩn bị các tế bào khả biến *Agrobacterium* GV3101, chủng *Agrobacterium* GV3101 được cấy hạt trong 5ml môi trường LB dưới điều kiện 30°C và 200 vòng/phút trong 12 giờ. Môi trường nuôi cấy được cấy vào 200ml môi trường LB, và sau đó được nuôi cấy ở 200 vòng/phút trong 3~4 giờ ở 30°C, và được ly tâm ở 3000 xg trong 20 phút ở 4°C. Viên pellet được rửa bằng nước cất vô trùng, và được tạo huyền phù lại trong 20ml môi trường LB. Các phần 200µl được cấp đông đột ngột bằng nitơ lỏng được bảo quản trong tủ đông sâu.

Mỗi *Agrobacterium* được biến nạp được nuôi cấy trong môi trường kháng sinh (thạch LB chứa spectinomycin) và được sàng lọc. Khuẩn lạc đã sàng lọc được nuôi cấy lỏng trong canh LB. Sau khi *Agrobacterium* được thu hoạch từ môi trường nuôi cấy, nó được tạo huyền phù lại trong sucroza 5% (w/v), dung dịch Silwet L-77 0,05% (v/v) (Momentive performance material company) ở độ hấp thụ (OD₆₀₀) là 0,8. Bằng phương pháp nhúng Floral, *A. thaliana* kiểu đại kiểu sinh thái Col-0 được biến nạp, và sau đó hạt giống (T₁) được thu hoạch 1~2 tháng sau.

Gen bar trong vector hai thành phần được sử dụng để sàng lọc thể biến nạp cá thể. Hạt giống T₁ thu được được gieo trong môi trường 1/2 MS (2,25 g/L muối MS, 10 g/L sucroza, 7 g/L thạch agar) được bổ sung glufosinat 25µM, và cây trồng sống sót được chọn sau 7 ngày gieo, và trồng lại vào đất.

Để kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của cây trồng chuyển gen, cây trồng 4 tuần tuổi được phun đều với 100 ml dung dịch tiafenaxil 1µM (0,05%

Silwet L-77) với mỗi diện tích 40 x 60 cm (0,24 m²). Trong khi *A. thaliana* kiểu đại (kiểu sinh thái Col-0; kiểu sinh thái Columbia-0) chết hoàn toàn trong vòng 7 ngày sau xử lý, mỗi thể biến nạp cho thấy không có tổn thương nào với việc xử lý thuốc diệt cỏ ức chế PPO.

Hạt giống T₂ được thu hoạch từ cây trồng sống sót được gieo vào môi trường 1/2 MS (2,25 g/L muối MS, 10 g/L sucroza, 7 g/L thạch agar) được bổ sung glufosinat 25μM, và sau 1 tuần, cây trồng sống sót được trồng lại vào đất.

Để xác nhận số lượng bản sao của mỗi dòng, tỷ lệ chia tách được kiểm tra với hạt giống T₂.

Khả năng chống chịu tiafenaxil của thể biến nạp 4 tuần tuổi được xác nhận bằng cách phun 100ml dung dịch tiafenaxil (tiafenaxil 1μM, 5μM, 10μM hoặc 25μM + 0,05% Silwet L-77) với mỗi diện tích 40 x 60 cm (0,24 m²). Hạt giống T₃ được thu hoạch từ cây trồng T₂ chống chịu tiafenaxil.

Các hạt giống được chọn trong môi trường 1/2 MS chứa glufosinat 25μM, và các dòng trong đó tất cả các cá thể chống chịu glufosinat được đánh giá là các dòng đồng nhất.

7-2. Sự nảy mầm hạt giống

Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thể biến nạp *A. thaliana* được đưa gen kiểu đại hoặc gen biến thể của CyPPO10 và CyPPO13 vào được xác nhận.

Hạt giống thể hệ T₃ của mỗi thể biến nạp được gieo trong môi trường 1/2 MS chứa thuốc diệt cỏ. Hạt giống kiểu sinh thái Col-0 (*Arabidopsis* kiểu đại) được sử dụng làm đối chứng. Loại thuốc diệt cỏ và nồng độ là như sau:

FIG. 31a: glufosinat 25μM (PPT), tiafenaxil 70nM, saflufenaxil 100nM, glufosinat 25μM + tiafenaxil 70nM, hoặc glufosinat 25μM + tiafenaxil 30nM + saflufenaxil 40nM;

FIG. 31b và 31c: glufosinat 25μM (PPT), tiafenaxil 0,1μM hoặc 1μM, saflufenaxil 0,3μM hoặc 3μM, flumioxazin 0,1μM hoặc 1μM, pyraclonil 0,5μM hoặc 5μM, hoặc sulfentrazone 1μM hoặc 10μM.

Kết quả của sự nảy mầm hạt giống trong 7 ngày sau khi gieo được thể hiện trên FIG. 31a, 31b, và 31c. Trên các FIG. 31a đến 31c, 10-3 dùng để chỉ CyPPO10 kiểu đại,

10FM-4-7 chỉ dòng chuyển gen CyPPO10 F360M, 10FL-1-9 chỉ dòng chuyển gen CyPPO10 F360L, 10FC-3-5 chỉ dòng chuyển gen CyPPO10 F360C, 10AC-5-4 chỉ dòng chuyển gen CyPPO10 A167C, 13-1 chỉ CyPPO13 kiểu dại, 13FM-3-1 chỉ dòng CyPPO13 F373M chuyển gen, 13FC-1-1 chỉ dòng CyPPO13 F373C chuyển gen, 13FI-2-1 chỉ dòng CyPPO13 F373I chuyển gen, 13AC-1-3 chỉ dòng CyPPO13 A177C chuyển gen, CyPPO13_ALFL chỉ dòng CyPPO13 A177L+F373L chuyển gen, và CyPPO13_ALFI chỉ dòng CyPPO13 A177L+F373I chuyển gen, theo thứ tự.

Như được thể hiện trên các FIG. 31a đến 31c, trong khi *A. thaliana* kiểu dại (kiểu sinh thái Col-0) nảy mầm trong môi trường 1/2 MS không chứa thuốc diệt cỏ, nó không nảy mầm trong môi trường 1/2 MS chứa thuốc diệt cỏ. Do đó, thử nghiệm nảy mầm trên môi trường chứa thuốc diệt cỏ là hữu ích để đánh giá khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ.

Trong khi đó, các dòng *A. thaliana* T₃ được biến nạp trong đó gen kiểu dại CyPPO10, gen thể đột biến CyPPO10 (F360M, F360I, F360L, F360C, A167C), gen kiểu dại CyPPO13 hoặc gen thể đột biến CyPPO13 (F373M, F373C, F373I, A177C, A177L+F373L, A177L+F373I) nảy mầm trong môi trường chứa thuốc diệt cỏ (chứa glufosinat 25µM, glufosinat 25µM + tiafenaxil 70nM, hoặc glufosinat 25µM + tiafenaxil 30nM + saflufenaxil 40nM). Các kết quả này chỉ ra rằng gen bar (gen chống chịu glufosinat) và gen CyPPO (gen chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO) có chức năng như tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ đồng thời và độc lập trong cây trồng chuyển gen.

Như được thể hiện trên Fig. 31a đến 31c, trong môi trường chứa các loại thuốc diệt cỏ ức chế PPO khác nhau và ở các nồng độ khác nhau, *A. thaliana* được biến nạp thường nảy mầm và sống sót, trong khi Col-0 thường không nảy mầm. Kết quả này chỉ ra rằng *A. thaliana* được biến nạp tạo ra khả năng chống chịu hoặc giữ lại khả năng chống chịu được tăng cường với các thuốc diệt cỏ ức chế PPO khác nhau bởi gen đã chèn của thể biến nạp.

7-3. Kiểm tra sự biểu hiện protein PPO trong *A. thaliana* được đưa gen CyPPO vào (T₂)

Mỗi sự biểu hiện protein được kiểm tra trong thể biến nạp *A. thaliana* (T₂) trong đó gen mã hóa CyPPO10, biến thể CyPPO10 (F360I hoặc F360M), CyPPO13, hoặc biến thể CyPPO13 (F373M) được chèn, theo thứ tự.

Lá của thể biến nạp *A. thaliana* bốn tuần tuổi được nghiền bằng nitor lỏng, và

protein được chiết bằng cách bổ sung đệm chiết protein (Tris-Cl 0,05M pH=7,5, NaCl 0,1M, EDTA 0,01M, Triton X-100 1%, 1mM DTT). Sau đó, thấm tách western được thực hiện sử dụng kháng thể kháng HA (Santa cruz). Protein được biểu hiện trong thể biến nạp được phát hiện sử dụng thể HA. Để so sánh lượng protein đã tải, lượng cấu trúc dưới phân tử lớn RuBisCO được xác nhận bằng cách nhuộm xanh Coomassie. Hai dòng độc lập với mỗi biến thể được kiểm tra, và Col-0 được sử dụng làm đối chứng.

Kết quả được thể hiện trên FIG.7. Tất cả các thể biến nạp *A. thaliana* được đưa gen biến thể CyPPO10 (biến thể F360I hoặc biến thể F360M) hoặc biến thể CyPPO13 (biến thể F373M) vào đều biểu hiện thành công protein PPO.

7-4. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của *A. thaliana* được biến nạp (T₂ hoặc T₃)

Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được kiểm tra với thể biến nạp *A. thaliana* (T₂ hoặc T₃) trong đó gen mã hóa CyPPO10, biến thể CyPPO10 (F360C, F360I, F360L, F360M, F360V, F360T, A167C, A167L, A167L+F360M, A167C+F360M, A167C+F360I, hoặc V305M+F360M), CyPPO13, hoặc biến thể CyPPO13 (A177C, F373C, F373I, F373M, A177L+F373I, hoặc A177L+F373L) được đưa vào theo thứ tự.

Sau khi xử lý thể biến nạp CyPPO10 hoặc CyPPO13 (T₃) ở lượng 100 ml mỗi diện tích 40 X 60 cm (0,24 m²) bằng dung dịch tiafenaxil (tiafenaxil 1 μM + 0,05% (v/v) Silwet L-77), mức độ tổn thương của cây trồng được đánh giá ở ngày 7. Để so sánh, cùng một thử nghiệm được thực hiện sử dụng *A. thaliana* kiểu dại (kiểu sinh thái Col-0).

Kết quả được thể hiện trên FIG. 8.

Ngoài ra, sau khi xử lý bằng 100 ml dung dịch tiafenaxil (tiafenaxil 1 μM, 5 μM, 10 μM, hoặc 25 μM + 0,05% (v/v) Silwet L-77) với mỗi diện tích 40 X 60 cm (0,24 m²) cho thể biến nạp (T₂) với gen mã hóa biến thể CyPPO10 (F360C, F360I, F360L, F360M, F360V, F360T, A167C, A167L, A167L+F360M, hoặc A167C+F360I) hoặc biến thể CyPPO13 (A177C, F373C, F373I, F373M, A177L+F373I, hoặc A177L+F373L), mức độ tổn thương của cây trồng được đánh giá ở ngày 7.

Kết quả được thể hiện trên FIG.9 (thể biến nạp T₂ được đưa gen biến thể CyPPO10 vào) và FIG. 10 (thể biến nạp T₂ được đưa gen biến thể CyPPO13 vào).

Ngoài ra, mức độ tổn thương (chỉ số tổn thương) của mỗi dòng sau khi xử lý tiafenaxil trên FIG. 8 đến 10 được thể hiện trong bảng 14 sau đây làm chỉ số.

Bảng 14

Chỉ số tổn thương T₂ (mức độ tổn thương)

	Dòng số	Tiafenaxil	Chỉ số tổn thương trung bình
Col-0		1 μ M	5
CyPPO10			
Kiểu đại		1 μ M	0,5
F360C	3	1 μ M	0,3
		5 μ M	0,9
F360I	7	1 μ M	0
		5 μ M	0,1
F360L	3	1 μ M	0
		5 μ M	0,3
F360M	4	1 μ M	0,1
		5 μ M	0,3
F360V	4	1 μ M	0
		5 μ M	0,3
F360T	3	1 μ M	2,6
A167C	3	1 μ M	0
A167L	3	1 μ M	0,2
A167L+F360M	12	25 μ M	2
A167C+F360I	19	25 μ M	2
CyPPO13			
Kiểu đại		1 μ M	0,5
A177C	1	1 μ M	0
F373C	2	1 μ M	0,1
F373I	2	1 μ M	0,1
F373M	2	1 μ M	0
A177L+F373I	9	10 μ M	1,5
A177L+F373L	7	10 μ M	0

Sau khi xử lý bằng dung dịch tiafenaxil (tiafenaxil 25 μ M + 0,05% (v/v) Silwet L-77) hoặc dung dịch saflufenaxil (saflufenaxil 100 μ M + 0,05% (v/v) Silwet L-77) ở lượng 100ml với mỗi diện tích 40 X 60 cm (0,24 m²) cho thể biến nạp (T₃) trong đó gen mã hóa biến thể CyPPO10 (F360I, F360L, F360M, A167C+F360I, A167C+F360M, hoặc V305M+F360M) được đưa vào, mức độ tổn thương của cây trồng được đánh giá ở ngày 7.

Kết quả của thể biến nạp T₃ được đưa gen mã hóa biến thể CyPPO10 vào được thể hiện trên FIG. 32.

Ngoài ra, mức độ tổn thương (chỉ số tổn thương) bởi việc xử lý tiafenaxil hoặc saflufenaxil cho thể biến nạp *A. thaliana* được đưa gen đột biến CyPPO10 vào được thể hiện trong bảng 15 sau đây dưới dạng chỉ số.

Bảng 15

Chỉ số tổn thương T₃ (mức độ tổn thương)

		Dòng số	Tiafenaxil	Chỉ số tổn thương trung bình	Saflufenaxil	Chỉ số tổn thương trung bình
Col-0			25 μ M	5	100 μ M	5
CyPPO10	F360I	7-2	25 μ M	1	100 μ M	1,1
		10-2			100 μ M	0
	F360M	4-7	25 μ M	2		
	F360L	3-2	25 μ M	1		
	A167C+F360I	1-4	25 μ M	2		
	A167C+F360M	4-5	25 μ M	2		
	V305M+F360M	6-5	25 μ M	2		

Bảng 14 và 15 thể hiện giá trị trung bình của mức độ tổn thương của các cá thể được thử nghiệm (10 đến 20 cá thể) theo các tiêu chuẩn của bảng 16 sau đây.

Bảng 16

Định nghĩa mức độ tổn thương

Chỉ số tổn thương	Triệu chứng
0	Không có tổn thương
1	Cuối lá bị khô hoặc cháy xém ít hơn 20%
2	Hơn 20% và ít hơn 30% cây trồng bị cháy xém
2,5	Hơn 30% và ít hơn 50% cây trồng bị cháy xém
3	Hơn 50% và ít hơn 70% cây trồng bị cháy xém
4	Hơn 70% cây trồng bị cháy xém
5	Toàn bộ cây bị khô và chết

Mức độ chống chịu thể biến nạp *A. thaliana* (T₃) được đưa gen đột biến CyPPO10 (F360I hoặc A167L+F360M) hoặc gen đột biến CyPPO13 (A177L+F373L hoặc A177L+F373I) vào được xác nhận ở ngày thứ 7 sau khi xử lý tiafenaxil, saflufenaxil, flumioxazin, hoặc sulfentrazon (50 μ M mỗi loại). Để so sánh, *A. thaliana* kiểu dại hoặc thể biến nạp *A. thaliana* PPO1 SLYM (AtPPO1 SLYM, S305L+Y426M) (T₃) đã được biết về khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO được thử nghiệm ở cùng điều kiện.

Trong thử nghiệm khả năng chống chịu các thuốc diệt cỏ khác nhau, 100ml nồng độ 50 μ M của mỗi thuốc diệt cỏ được phun đều cho mỗi diện tích 40 x 60 cm (0,24 m²). Phân tử lượng (MW) của tiafenaxil, saflufenaxil, flumioxazin và sulfentrazon lần lượt là 511,87, 500,85, 354,34 và 387,18. Liều xử lý được chuyển hóa tương ứng với 106,7 g ai/ha tiafenaxil, 104,4 g ai/ha saflufenaxil, 73,8 g ai/ha flumioxazin và 80,7 g ai/ha sulfentrazon.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 33a và 33b.

Ngoài ra, mức độ tổn thương (chỉ số tổn thương) của thể biến nạp được thể hiện trên FIG. 33 và bảng 17 làm chỉ số.

Bảng 17

Chỉ số tổn thương T₃ (mức độ tổn thương)

	Cy10 FI	AtPPO1 SLYM	Cy10 ALFM
Tiafenaxil	1	4	1
Saflufenaxil	0	0-1	0-1
Flumioxazin	0-1	4-5	1
Sulfentrazon	0-1	0-1	1

Trên FIG. 33a và bảng 17, Cy10 FI, AtPPO1 SLYM, Cy10 ALFM lần lượt biểu diễn thể biến nạp của CyPPO10 F360I, S305L+Y426M của AtPPO1 (đối chứng), và CyPPO10 A167L+F360M.

Trên FIG. 33b, Col-0, Cy13 ALFL và Cy13 ALFI lần lượt biểu diễn kiểu đại, thể biến nạp của CyPPO13 A177L+F373L và CyPPO13 A177L+F373I.

Như được thể hiện trên FIG. 33a, thể biến nạp của gen thể đột biến có khả năng chống chịu ngang bằng hoặc lớn hơn AtPPO1 SLYM. Được chứng minh là tất cả trong số CyPPO10 FI và CyPPO10 ALFM tạo ra mức chống chịu cao hơn đối với các thuốc diệt cỏ khác nhau so với AtPPO1 SLYM.

Như được thể hiện trong bảng 14 và FIG 8, gần như tất cả thể biến nạp với kiểu đại CyPPO10, gen biến thể của nó, kiểu đại CyPPO13, hoặc gen biến thể của nó phát triển sau khi xử lý tiafenaxil 1µM trong khi kiểu đại *A. thaliana* (Col-0) bị chết.

Ngoài ra, như được thể hiện trong bảng 15 và 17, FIG 9 đến 10, và FIG 32 đến 33, thể biến nạp *A. thaliana* được đưa gen biến thể CyPPO10 hoặc CyPPO13 vào không có hoặc có mức tổn thương ít sau khi xử lý với hơn 5µM tiafenaxil. Kết quả chỉ ra rằng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của *A. thaliana* được tạo ra và/hoặc được tăng cường bằng cách đưa CyPPO10, CyPPO13, hoặc gen đột biến của chúng vào.

Được chứng minh là khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được duy trì đến thế hệ T₂ đến T₃, chỉ ra rằng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được truyền ổn định ngay cả khi thế hệ tiến triển.

Từ kết quả này, các biến thể CyPPO được mong đợi là tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO khác nhau cho cây trồng khác cũng như *A. thaliana*.

7-5. Xác nhận độ ổn định gen chuyển qua các thế hệ

Trong ví dụ này, việc các gen được đưa vào *A. thaliana* có được di truyền ổn định qua các thế hệ hay không được xác nhận.

Thế biến nạp T₃ các dòng 7-2, 10-2, và 10-5 được biến nạp với CyPPO10 F360I được phát triển tiếp đến thế hệ T₄, T₅, và do đó khả năng chống chịu tiafenaxil hoặc saflufenaxil và sự biểu hiện của gen được đưa vào ở thế hệ T₄ và T₅ của mỗi dòng được xác nhận.

Chiết protein

Protein được chiết từ cây trồng của mỗi thế hệ. Sau khi nghiền cây giống sử dụng nitor lỏng, đệm chiết protein (Tris-Cl 0,05 M pH=7,5, NaCl 0,1M, EDTA 0,01M, Triton X-100 1%, DTT 1mM) được bổ sung và protein tổng được chiết. Sau khi protein được chiết được chuyển đến màng PVDF sau điện di, thấm tách western được thực hiện sử dụng kháng thể kháng HA (Santacruz).

Xác nhận khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ

Một trăm mililit dung dịch thuốc diệt cỏ chứa tiafenaxil 15µM hoặc saflufenaxil 150µM được phun đều trong diện tích 40 x 60 cm (0,24 m²) lên *A. thaliana* 4 tuần sau khi trồng lại. Mức độ tổn thương bởi thuốc diệt cỏ được quan sát ở ngày 7 sau khi xử lý.

Kết quả của khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được thể hiện trên FIG. 34 (T₄) và FIG. 35 (T₅), và mức độ tổn thương (chỉ số tổn thương) của thế biến nạp bởi thuốc diệt cỏ được thể hiện trong bảng 18.

Bảng 18

Chỉ số tổn thương T₄ và T₅ (mức độ tổn thương)

	CyPPO10 F360I	
	T ₄	T ₅
Tiafenaxil	0,5	0,5
Saflufenaxil	0	1

Trong khi đối chứng âm (Col-0; kiểu đại *A. thaliana*) dễ bị tác động bởi việc xử lý thuốc diệt cỏ, thế biến nạp T₄ và T₅ *A. thaliana* của CyPPO10 F360I có khả năng

chống chịu.

Ngoài ra, phân tích thẩm tách western đối với sự biểu hiện gen chuyển được thể hiện trên FIG. 36. Protein CyPPO10 F360I được phát hiện ở cả thể hệ T₄ và T₅ của thể biến nạp.

Do đó, được chứng minh là khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ bằng cách đưa biến thể CyPPO10 vào được di truyền ổn định và duy trì qua các thế hệ T₄ và T₅.

Ví dụ 8. Tạo cấu trúc thể biến nạp cây đậu tương sử dụng CyPPO và biến thể của nó và thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO

8-1. Vector tái tổ hợp đối với việc biến nạp cây đậu tương và tạo cấu trúc thể biến nạp cây đậu tương sử dụng vector này

Vector để biến nạp cây đậu tương để tạo ra khả năng chống chịu tiafenaxil bằng cách biểu hiện gen CyPPO10 A167L+F360M được tạo cấu trúc.

Cụ thể là, gen CyPPO10 A167L+F360M kết hợp với peptit vận chuyển của gen PPO1 *A. thaliana* được khuếch đại bằng PCR sử dụng vector dùng để biến nạp *A. thaliana* (tham khảo FIG. 6) làm khuôn. Sản phẩm khuếch đại được tách dòng sử dụng bộ kit tách dòng pENTR Directional TOPO (Invitrogen), và được biến nạp vào tế bào khả biến DH5 alpha (Invitrogen). Sau đó, gen được tách dòng được chuyển vào vector, vector hai thành phần pB2GW7.0 (FIG. 37) để biến nạp cây trồng, sử dụng bộ kit Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). Sau khi trộn vector pENTR/D-TOPO trong đó gen CyPPO10 A167L+F360M được tách dòng, đệm TE, và hỗn hợp enzym LR Clonase II, nó được ủ ở 25°C trong 1 giờ. Sau khi thêm dung dịch Proteinase K (Invitrogen) vào hỗn hợp phản ứng, hỗn hợp được ủ trong 10 phút ở 37°C, và được biến nạp vào tế bào khả biến DH5 alpha.

Agrobacterium EHA105 được biến nạp điện tử với vector hai thành phần đã được tạo cấu trúc như ở trên.

Cây đậu tương Kwangan được sử dụng để tạo cấu trúc cho thể biến nạp cây đậu tương.

Sau khi loại bỏ lớp vỏ hạt ra khỏi hạt giống cây đậu tương, trụ dưới lá mầm được cắt và làm bị thương 7-8 lần bằng dao phẫu thuật (lưỡi #11). Khoảng 50 mẫu mô cây được trộn với *A. tumefaciens* EHA105 được biến nạp (Hood et al., New *Agrobacterium*

helper plasmids for gene transfer to plant (EHA105). Trans Res. 1993 2:208-218), và hỗn hợp được nghiền bằng sóng âm trong 20 giây và sau đó được ủ trong 30 phút để cấy. Nó được đặt lên CCM (môi trường đồng nuôi cấy; 0,32 g/L Gamborg B5, 4,26 g/L MES, 30 g/L sucroza, 0,7% thạch agar). Sau đó, nó được đồng nuôi cấy trong buồng sinh trưởng (25°C, 18 giờ sáng/6 giờ tối) trong 5 ngày.

Sau đó, nó được rửa trong 10 phút trong 1/2 SIM lỏng (môi trường cảm ứng chồi; 3,2 g/L Gamborg B5, 1,67 mg/L BA, MES 3 mM, 0,8% (w/v) thạch agar, 3% (w/v) sucroza, 250 mg/L cefotaxime, 50 mg/L vancomycin, 100 mg/L ticarxillin, pH=5,6) và được đặt lên SIM không có các chất kháng sinh và được nuôi cấy trong buồng sinh trưởng (25°C, 18 giờ sáng/6 giờ tối) trong 2 tuần.

Mô cấy cảm ứng chồi được trồng lại trên SIM-1 (môi trường SIM được bổ sung 10 mg/L DL-phosphinothrixin, pH=5,6).

Chồi bị nâu được trồng lại trên SEM (môi trường kéo dài chồi; 4,4 g/L muối MS, MES 3 mM, 0,5 mg/L GA3, 50 mg/L Asparagin, 100 mg/L axit pyroglutamic, 0,1 mg/L IAA, 1 mg/L zeatin, sucroza 3% (w/v), thạch agar 0,8% (w/v), 250 mg/L cefotaxim, 50 mg/L vancomycin, 100 mg/L ticarxillin, 5 mg/L DL-phosphinothrixin, pH=5,6). Chồi sau khi kéo dài đến chiều cao hơn 4cm được chuyển lên RIM (môi trường cảm ứng rễ; 4,4 g/L muối MS, MES 3mM, sucroza 3%, thạch agar 0,8%, 50 mg/L cefotaxim, 50 mg/L vancomycin, 50 mg/L ticarxillin, 25 mg/L asparagin, 25 mg/L axit pyroglutamic, pH=5,6).

Khi rễ mọc đầy đủ, cây trồng được chuyển đến đất nền (Bioplug No. 2, Farmhannong) được trộn với vermiculit ở tỷ lệ 2:1 (v/v). Sau 10 ngày, lá được sơn bằng 100 mg/L DL-phosphinothrixin.

8-2. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây đậu tương được biến nạp

Năm micromol hoặc 15 μ M tiafenaxil được sơn lên lá của dòng số 2 của cây đậu tương được biến nạp CyPPO10 A167L+F360M (thế hệ T₀) và cây đậu tương không được biến nạp (Kwangan; cây đậu tương kiểu dại, đối chứng) 2~3 lần bằng chổi cọ. Dung dịch tiafenaxil chứa 0,05% (v/v) Silwet L-77 làm chất hoạt động bề mặt.

Như được thể hiện trên FIG. 38, Kwangan (cây đậu tương không được biến nạp) có tổn thương nghiêm trọng 7 ngày sau khi xử lý 5 μ M tiafenaxil, nhưng cây đậu tương

được biến nạp CyPPO10 A167L+F360M cho thấy không có sự tổn thương ngay cả sau khi xử lý bằng tiafenaxil 15 μ M.

Trong khi đó, tiafenaxil hoặc saflufenaxil được xử lý với thể hệ T₁ của thể biến nạp CyPPO10 A167L+F360M dòng số 2 ở giai đoạn V2~3. 100 ml tiafenaxil 25 μ M hoặc saflufenaxil 150 μ M được phun đều lên diện tích 40 X 60 cm (0,24m²), và mức độ tổn thương được đánh giá 5 ngày sau khi phun.

Trên FIG. 40, cây đậu tương Kwangan được sử dụng làm đối chứng. So với mẫu đối chứng, cây đậu tương biến nạp CyPPO10 A167L+F360M (10ALFM) cho thấy không có tổn thương nào ngay cả sau khi xử lý với nồng độ tương đối cao của tiafenaxil hoặc saflufenaxil.

8-3. Xác nhận số lượng gen được chèn trong cây đậu tương được biến nạp

ADN bộ gen được chiết trong 250mg mô lá của dòng số 2 hoặc 23 được biến nạp CyPPO10 A167L+F360M, để phân tích số lượng bản sao của gen chuyển.

ADN bộ gen được chiết sử dụng phương pháp đệm CTAB. Sau khi nghiền mô lá sử dụng cối và chày trong nito lỏng, 1,25ml đệm phân lập ADN (2% (w/v) CTAB, NaCl 1,5M, EDTA 25mM, 0,2% (v/v) beta-mercaptoetanol, Tris-Cl 100mM (pH=8,0)) được bổ sung và lắc xoáy. Sau khi gia nhiệt ở 60°C trong 1 giờ, 1 thể tích cloroform:rượu isoamyllic (24:1) được bổ sung và được trộn bằng cách đảo. Sau khi ly tâm ở 7000 xg trong 10 phút ở 4°C, chất nổi bề mặt được chuyển đến ống mới và 2,5 thể tích etanol được trộn. Sau khi ly tâm ở 5000 xg trong 5 phút ở 4°C, chất nổi bề mặt được bỏ đi và viên pellet được hòa tan bằng đệm TE (LPSS). Sau khi bổ sung 20 μ g/ml RNaza A (Bioneer), nó được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi bổ sung 1 thể tích phenol:cloroform (1:1), nó được trộn và được ly tâm ở 10.000 xg trong 10 phút ở 4°C. Chất nổi bề mặt được chuyển đến ống mới, và sau đó 1 thể tích cloroform:rượu isoamyllic (24:1) được bổ sung và được trộn. Sau khi ly tâm ở 10.000 xg trong 10 phút ở 4°C, chất nổi bề mặt được chuyển đến ống mới và 01 thể tích NaOAc (pH=5,2) và 2 thể tích etanol được bổ sung và được trộn. Sau khi ly tâm ở 5000 xg trong 5 phút ở 4°C, nó được rửa bằng 70% etanol. Sau khi làm khô bằng không khí, ADN bộ gen được hòa tan bằng lượng đệm TE thích hợp.

10~40 μ g ADN đã chiết được phân rã qua đệm sử dụng EcoRI (Enzynomics).

Sau đó, sau khi điện di 0,8% (w/v) gel Agarosa (50 V), gel được xử lý như sau:

- 1) khử purin: HCl 0,25N, lắc 15 phút
- 2) làm biến tính: NaOH 0,5M, NaCl 1,5M, lắc 30 phút
- 3) trung hòa: Tris 0,5M (pH=7,5), NaCl 1,5M, lắc 20 phút

Sau đó, các đoạn ADN được chuyển đến màng nitroxenluloza sử dụng phương pháp chuyển mao dẫn, liên kết chéo được thực hiện sử dụng UV Crosslinker (UVC-508; ULTRA LUM Inc.).

Bước lai được thực hiện theo phương pháp sau đây: màng nitroxenluloza được nhúng trong dung dịch DIG Easyhybridization (Roche), và được ủ ở 42°C trong 3 giờ. Sau đó, dung dịch được bỏ đi, được thế bằng dung dịch DIG Easyhybridization mới với đoạn dò được đánh dấu DIG, và được ủ trong thời gian từ 16 đến 18 giờ ở 42°C.

Đoạn dò (đoạn dò CyPPO8-M được đánh dấu DIG) được đánh dấu bằng phản ứng PCR như sau:

PCR đoạn dò

Gen bar được đánh dấu DIG được khuếch đại sử dụng DIG dUTP (Jena bioscience), và đoạn môi được sử dụng sau đó là như sau:

Đoạn môi xuôi cho đoạn dò bar: 5'- TTC CGT ACC GAG CCG CAG GA-3'
(SEQ ID NO: 124)

Đoạn môi ngược cho đoạn dò bar: 5'- CGT TGG GCA GCC CGA TGA CA-3'
(SEQ ID NO: 125)

PCR: sử dụng kit Solgent e-Taq

Điều kiện: 95°C trong 5 phút, 35 chu trình gồm 94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, và 72°C trong 30 giây, và 72°C trong 2 phút

Sau khi lai, màng được rửa trong đệm rửa độ nghiêm ngặt thấp (2X SSC, SDS 0,1%) và đệm rửa độ nghiêm ngặt cao (0,5X SSC, SDS 0,1%). Tín hiệu thẩm tách Southern được phát hiện như sau:

- 1) lắc trong 30 phút sau khi bổ sung đệm phong bế (Roche) vào màng
- 2) lắc trong 30 phút sau khi bổ sung kháng thể DIG (các mảnh Fab kháng

digoxigenin-AP, Roche)

3) lắc trong 15 phút trong đệm rửa (Roche)

4) lắc trong 3 phút sau khi bổ sung đệm phát hiện (Roche)

5) Sau khi sử dụng CDP-Star (Roche) cho màng, phát triển vết trên màng tia x.

Đối với đối chứng âm, ADN bộ gen của cây đậu tương không được biến nạp Kwangan được sử dụng để thẩm tách southern.

Trên FIG. 39, số lượng các dải thể hiện trên màng có nghĩa là số lượng gen chuyển. Vì một dải được quan sát trong thể biến nạp CyPPO10 A167L+F360M dòng số 2 hoặc dòng số 23, được xác định là mỗi cây trồng chuyển gen có một bản sao gen chuyển duy nhất.

Ví dụ 9: Thử nghiệm hoạt tính của gen đột biến có độ đồng nhất trình tự với biến thể PPO

PCR tạo lỗi ngẫu nhiên được thực hiện ở các điều kiện sau đây sử dụng plasmid CyPPO (vector pACBB) làm khuôn, nhờ đó gây ra các đột biến ngẫu nhiên trong CyPPO:

Khuôn	0,5 µl
10X đệm	5 µl
MnCl ₂ 10 mM	1,5 µl
dNTP	5 µl
e-Taq (Solgent Inc.)	1 µl
đoạn môi xuôi (100 µM)	0,5 µl
đoạn môi ngược (100 µM)	0,5 µl
DDW	36 µl

Tổng 50 µl

10X đệm: Tris-Cl 100 mM, pH=8,3; KCl 500mM, MgCl₂ 70mM, 0,1% (w/v)

gelatin

dNTP: dATP 10mM, dGTP 10mM, dCTP 100mM, dTTP 100mM

94°C 3 phút; (94°C 30 giây, 57°C 30 giây, 72°C 1,5 phút, 72°C 5 phút) 35 chu trình

Trình tự đoạn mồi:

CyPPO10_BamHI F

ccccggatccATGATTGAAGTGGATGTGGCTA (SEQ ID NO: 126)

CyPPO10_XhoI R

ccccctcgagTGATTGTCCACCAGCGAGGTAAG (SEQ ID NO: 127)

CyPPO13_BamHI F

ccccggatccATGAACCCTGCTACCCCTGAAC (SEQ ID NO: 128)

CyPPO13_XhoI R

ccccctcgagCACCTGTGATAACAACCTGCTGAG (SEQ ID NO: 129)

Sản phẩm PCR tạo lỗi ngẫu nhiên thu được được chạy điện di trong gel agarosa và sau đó làm sạch gel, và vector pACBB và sản phẩm PCR được phân rã bằng enzym giới hạn BamHI và XhoI. Vector và sản phẩm PCR đã được phân rã được chạy điện di trong gel agarosa được làm sạch, và thực hiện bước nối. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào khả biến BT3, và gen CyPPO đột biến từ các khuẩn lạc BT3 đang phát triển được đọc trình tự. BT3 được xác nhận là có gen CyPPO đột biến được cấy điểm trên đĩa LB chứa các nồng độ khác nhau (0µM, 50µM, 100µM, và 200µM) của tiafenaxil hoặc saflufenaxil, nhờ đó kiểm tra sự sinh trưởng của *E. coli*, và thử nghiệm mức chống chịu thuốc diệt cỏ.

Trong số các dòng vô tính được gây đột biến, dòng vô tính có các đột biến sau đây được sử dụng cho thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ này:

CyPPO10m-6: chứa 9 đột biến axit amin (E225G, G258S, Q266L, T336I, V356F, F360M, A364D, R406G, W419R); trình tự axit nucleic– SEQ ID NO: 130, trình tự axit amin – SEQ ID NO: 131 (độ đồng nhất trình tự 98% với trình tự axit amin của CyPPO10 kiểu dại)

Tế bào BT3 được biến nạp với gen đột biến của CyPPO10 được nuôi cấy trong môi trường chứa thuốc diệt cỏ, và tỷ lệ ức chế sự sinh trưởng tế bào được đo. Trên FIG. 41, 'AtPPO1 WT' dùng để chỉ PPO1 kiểu dại của *A. thaliana*, 'AtPPO1 SLYM' chỉ thể

đột biến PPO1 (Y426M+S305L) của *A. thaliana*, 'CyPPO10 WT' chỉ CyPPO10 kiểu dại, và 'CyPPO10m-6' chỉ CyPPO10 được gây đột biến như được mô tả ở trên, theo thứ tự.

Như được thể hiện trên FIG. 41, tế bào được biến nạp với đột biến CyPPO10 có độ đồng nhất trình tự bằng 98% hoặc cao hơn so với trình tự của kiểu dại CyPPO10 thể hiện khả năng phát triển tế bào tương đương với của các tế bào có CyPPO10 kiểu dại, ngay cả ở trường hợp môi trường chứa nồng độ cao (lên đến 200 μ M) của tiafenaxil hoặc saflufenaxil. Kết quả này chứng minh rằng thể đột biến CyPPO10 có độ đồng nhất trình tự bằng 98% hoặc cao hơn có thể vẫn giữ khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ (khả năng phát triển trong môi trường thuốc diệt cỏ chứa) của kiểu dại.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin này, trong đó ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm gồm N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360, và I408 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 độc lập được xóa hoặc được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), và K(Lys), và khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng.

2. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin này,

trong đó ít nhất một trình tự được chọn từ nhóm gồm N59, S60, R89, F161, V165, A167, Q184, P303, V305, F324, L327, I340, F360, và I408 của trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2 độc lập được thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), R(Arg), W(Trp), và G(Gly).

3. Polypeptit theo điểm 1, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin này,

trong đó trình tự axit amin được biến đổi bởi ít nhất một đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm F360M, F360V, F360I, F360T, F360L, F360C, A167C, A167L, A167I, P303L, V305L, V305M, V305T, N59T, S60T, R89A, R89L, R89V, F161A, V165S, V165C, Q184G, F324V, L327T, I340T, I408R, và I408W.

4. Polypeptit theo điểm 3, trong đó polypeptit chứa trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự bằng 95% hoặc cao hơn với trình tự axit amin này,

trong đó trình tự axit amin được biến đổi bởi đột biến axit amin gồm F360M, F360V, F360I, F360T, F360L, F360C, A167C, A167L, P303L, N59T, S60T, R89A, R89L, R89V, F161A, V165S, V165C, A167I, Q184G, V305L, V305M, V305T, F324V, L327T, I340T, I408R, I408W, P303L+V305L, N59T+F360V, S60T+V165S+F360M,

S60T+V165S+F360I, S60T+I340T+F360I, R89A+F360M, R89A+F360I, R89A+F360L, R89L+F360I, R89V+F360I, R89A+A167L+F360M, R89A+V305T+F360M, V165S+F360M, V165S+F360I, V165S+F360L, V165S+F360V, V165C+F360M, V165C+A167C+F360M, V165C+A167I+F360M, V165C+A167L+F360M, A167L+F360M, A167L+F360I, A167C+F360M, A167C+F360I, A167I+F360M, V305M+F360M, V305T+F360I, V305L+F360M, I408R+F360M, hoặc I408W+F360M.

5. Polynucleotit mã hóa polypeptit theo điểm 1.

6. Vector tái tổ hợp chứa polynucleotit theo điểm 5.

7. Tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp theo điểm 6.

8. Chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa ít nhất một thành phần được chọn từ nhóm gồm polypeptit theo điểm 1; polynucleotit mã hóa polypeptit này; vector tái tổ hợp chứa polynucleotit này; và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp này.

9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó thuốc diệt cỏ là ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphtalimit, phenyleste, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidindion, pyraclonil, flufenpyr-etyl và profluazol.

11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó thuốc diệt cỏ là ít nhất một loại được chọn từ nhóm gồm butafenaxil, saflufenaxil, benzfendizon, tiafenaxil, fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, axifluorfen, bifenox, etoxyfen, lactofen, chlometoxyfen, chlorintrofen, floglycofen-etyl, halosafen, pyraflufen-etyl, fluazolat, flumioxazin, cinidon-etyl, flumiclorac-pentyl, fluthiacet, thidiazimin, oxadiargyl, oxadiazon, carfentrazon, sulfentrazon, azafenidin, pentoxazon, pyraclonil, flufenpyr-etyl, profluazol, phenopylat, chất tương tự cacbamat của phenopylat, và muối được chấp nhận dùng trong nông nghiệp của nó.

12. Thể biến nạp của cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc dòng vô tính hoặc thế hệ con của nó, chứa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2,

polypeptit theo điểm 1, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit này.

13. Thẻ biến nạp, dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó theo điểm 12, trong đó thẻ biến nạp là tế bào cây, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây.

14. Phương pháp tạo ra cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, phương pháp bao gồm bước biến nạp tảo hoặc tế bào cây, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây, với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, polypeptit theo điểm 1, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit này.

15. Phương pháp tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, phương pháp bao gồm bước biến nạp tảo hoặc tế bào cây, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây, với polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, polypeptit theo điểm 1, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit này.

16. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt, phương pháp bao gồm bước cung cấp cây trồng chứa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, polypeptit theo điểm 1, hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit này cho đất trồng trọt, và sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt được thực hiện bằng cách sử dụng lần lượt hoặc đồng thời liều lượng có hiệu quả của hai hoặc nhiều hơn hai loại thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

18. Phương pháp theo điểm 16, trong đó cây trồng còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa polypeptit này, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt được thực hiện bằng cách sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và thuốc diệt cỏ thứ hai lần lượt hoặc đồng thời.

19. Phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn ra khỏi môi trường nuôi trồng, phương pháp này bao gồm bước:

cung cấp tảo chứa polypeptit được nêu trong SEQ ID NO: 2, polypeptit theo điểm 1 hoặc polynucleotit mã hóa polypeptit này cho môi trường nuôi trồng, và

sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

20. Phương pháp theo điểm 15, trong đó cây trồng hoặc tảo còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa polypeptit này, và khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai được tạo ra hoặc được tăng cường.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó thuốc diệt cỏ thứ hai được chọn từ nhóm gồm glyphosat, glufosinat, dicamba, 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic), isoxaflutole, thuốc diệt cỏ ức chế ALS (axetolactat synthaza), thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II, thuốc diệt cỏ gốc phenylure, thuốc diệt cỏ gốc bromoxynil, và các kết hợp của chúng.

22. Phương pháp theo điểm 20, trong đó polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai là ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm:

EPSPS chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza chống chịu glyphosat), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza) hoặc glyphosat decarboxylaza;

PAT chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat (phosphinothrixin-N-axetyltransferaza);

DMO chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba (dicamba monooxygenaza);

2,4-D monooxygenaza hoặc AAD (aryloxyalkanoat dioxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic);

ALS (axetolactat synthaza), AHAS (axetohydroxyaxit synthaza) hoặc AtAHASL (cấu trúc dưới phân tử lớn axetohydroxyaxit synthaza) chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS (axetolactat synthaza);

protein D1 hệ quang hóa II chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II;

xytocom P450 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure;

HPPD (hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza) chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế plastit;

nitrilaza chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và

các kết hợp của chúng.

23. Phương pháp theo điểm 20, trong đó gen mã hóa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai là ít nhất một gen được chọn từ nhóm gồm:

gen cp4 epsps, epsps (AG), mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 hoặc gat4621 chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat;

gen bar hoặc pat chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat;

gen dmo chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba;

gen AAD-1 hoặc AAD-12 chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic);

gen HPPDPF W336 chống chịu thuốc diệt cỏ isoxaflutol;

gen ALS, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, GM-HRA, S4-HRA, Zm-HRA, SurA hoặc SurB chống chịu thuốc diệt cỏ sulfonylure;

gen psbA chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II;

gen CYP76 B1 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure;

gen bxn chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và

các kết hợp của chúng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> FarmHannong Co., Ltd.

<120> Polypeptit biến thể của protoporphyrinogen oxidaza, chế phẩm tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng chứa polypeptit này và phương pháp kiểm soát cỏ dại

<130> OPP20173139KR

<150> KR 10-2016-0075358

<151> 2016-06-16

<160> 131

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1404

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit mã hóa CyPPO10

<400> 1
 atgattgaag tggatgtggc tattgttggt ggtggtctta gtggattgtc agtggcttgg 60
 agattacaga ggagtgtccc tcattattct ggagttcttc ttgaggcttc tgatagactt 120
 ggaggtaata tcactacaca agctgctgaa ggatttgtgt gggagcttgg tccaaacagt 180
 ttcgctccta ctccagcact cttacagttg attgctgaag ttggactcca ttctgagtta 240
 atcagaggag ataggcacct tccaagatat atatactgga ggggagaact ttatcctttg 300
 gagccaacta ggcctcttgc tttggcaaca tcaaactctt tgagtccttg gggaaagggt 360
 agagctgcac tcggagcttt aggttttgtg cctccatata ttggatctgg agatgaaagt 420
 gttgattctt tctttagaag gcatcttgga caagaagttg ctgagagatt ggtggcacca 480
 tttgtttcag gagtgtacgc tggagatcct caacagcttt ctgctgctgc tgctttttaga 540
 aggattgctc aacttgagaa gttgggaggt tcattgatcg ctggagcact cagattaaga 600
 aggcaacagc ctccacagcc aaaacctcca gctcaagtgc agatgagacc tggagaactc 660
 ggtagtttta gggaggggtc cgctgcatta cctagagcta tcgcacaaca gttgaaggca 720
 ccacttcatt tgcaaacacc tgttgaagct attacccttg agccaaaagg aggttatctc 780
 ttaaggagtg gtgaacagac ttggcacgct agatcagttg tgttggctac tccagcatac 840
 caaactgctg aacttgttgc accattccag cctgctatcg ctagagcttt ggctaccata 900
 ccttatccaa ctgttgcttg tgttgtgctt gcttaccctg ctggattggg tagatcagtt 960
 agacctggat ttggtgtttt ggtgcctaga ggacaaggta taaggacact cggaaccatt 1020


```

tggtcttcat gcttattccc acaaagaact cctgctgggtt ggcagggtttt tacctctttc 1080
ataggaggtg ctactgatcc tgatcttgca tcattgagag aagaggctat tgttgaacaa 1140
gtgcaacagg atctcacaag gcttcttgat cttcctgctg caaaggcaag actcttggggt 1200
atgaaggttt ggagaagggc tattccacaa tatatcggtt gttaccctca acagtggcaa 1260
caggtgacac acgctcttac ccagactcct ggtctcttct tatgttcaaa ctacgctgag 1320
ggagttgcat tgggagatag agtgaacac ggaaatagga ctgctgctgc tgtggctgct 1380
tacctcgctg gtggacaatc ataa 1404

```

```

<210> 2
<211> 467
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> CyPPO10

```

```

<400> 2
Met Ile Glu Val Asp Val Ala Ile Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu
 1          5          10          15
Ser Val Ala Trp Arg Leu Gln Arg Ser Ala Pro His Tyr Ser Gly Val
      20          25          30
Leu Leu Glu Ala Ser Asp Arg Leu Gly Gly Asn Ile Thr Thr Gln Ala
      35          40          45
Ala Glu Gly Phe Val Trp Glu Leu Gly Pro Asn Ser Phe Ala Pro Thr
      50          55          60
Pro Ala Leu Leu Gln Leu Ile Ala Glu Val Gly Leu His Ser Glu Leu
      65          70          75          80
Ile Arg Gly Asp Arg His Leu Pro Arg Tyr Ile Tyr Trp Arg Gly Glu
      85          90          95
Leu Tyr Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu Ala Leu Ala Thr Ser Asn
      100          105          110
Leu Leu Ser Pro Trp Gly Lys Val Arg Ala Ala Leu Gly Ala Leu Gly
      115          120          125
Phe Val Pro Pro Tyr Leu Gly Ser Gly Asp Glu Ser Val Asp Ser Phe
      130          135          140
Phe Arg Arg His Leu Gly Gln Glu Val Ala Glu Arg Leu Val Ala Pro
      145          150          155          160
Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Gln Gln Leu Ser Ala Ala
      165          170          175
Ala Ala Phe Arg Arg Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Gly Gly Ser Leu

```

36300

180	185	190
Ile Ala Gly Ala Leu Arg	Leu Arg Arg Gln Gln	Pro Pro Gln Pro Lys
195	200	205
Pro Pro Ala Gln Val	Gln Met Arg Pro Gly Glu	Leu Gly Ser Phe Arg
210	215	220
Glu Gly Leu Ala Ala Leu	Pro Arg Ala Ile Ala	Gln Gln Leu Lys Ala
225	230	235
Pro Leu His Leu Gln Thr	Pro Val Glu Ala Ile Thr	Pro Glu Pro Lys
245	250	255
Gly Gly Tyr Leu Leu Arg	Ser Gly Glu Gln Thr Trp	His Ala Arg Ser
260	265	270
Val Val Leu Ala Thr Pro	Ala Tyr Gln Thr Ala Glu	Leu Val Ala Pro
275	280	285
Phe Gln Pro Ala Ile Ala	Arg Ala Leu Ala Thr Ile	Pro Tyr Pro Thr
290	295	300
Val Ala Cys Val Val Leu	Ala Tyr Pro Ala Gly Leu	Gly Arg Ser Val
305	310	315
Arg Pro Gly Phe Gly Val	Leu Val Pro Arg Gly Gln	Gly Ile Arg Thr
325	330	335
Leu Gly Thr Ile Trp Ser	Ser Cys Leu Phe Pro Gln	Arg Thr Pro Ala
340	345	350
Gly Trp Gln Val Phe Thr	Ser Phe Ile Gly Gly Ala	Thr Asp Pro Asp
355	360	365
Leu Ala Ser Leu Arg Glu	Glu Ala Ile Val Glu Gln	Val Gln Gln Asp
370	375	380
Leu Thr Arg Leu Leu Asp	Leu Pro Ala Ala Lys Ala	Arg Leu Leu Gly
385	390	395
Met Lys Val Trp Arg Arg	Ala Ile Pro Gln Tyr Ile	Val Gly Tyr Pro
405	410	415
Gln Gln Trp Gln Gln Val	Thr His Ala Leu Thr Gln	Thr Pro Gly Leu
420	425	430
Phe Leu Cys Ser Asn Tyr	Ala Glu Gly Val Ala Leu	Gly Asp Arg Val
435	440	445
Glu His Gly Asn Arg Thr	Ala Ala Ala Val Ala Ala	Tyr Leu Ala Gly
450	455	460
Gly Gln Ser		
465		

<210> 3
 <211> 1458
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit mã hóa CyPP013

<400> 3

atgaaccctg ctaccctga acctttgaat gctgaagttg ttgtgattgg tgctggaatt	60
tctggattga ccttggttg gagactccaa cagggcttta gtgctagagg aggttctcca	120
caagcagttc ttttggtga agcatcttca aggggtgggag gttgtattag taccaggtct	180
aaggatggat atagatggga agagggctct aatagtttta ctccaacacc tgctctctta	240
aacctcattg cagaagttgg attaactgat caacttgtgt tggctgatgc aaagttgcca	300
agatatatct actgggaggg tgctcttttg ccagttcctc tttcacctgc tgctgctttg	360
ggatctaggc tttatcagt tggaggtaaa cttagagctt tgcagggact tttgggtttt	420
gttcctccac ctccaggtca tgaagagact gtgagacaat ttttcagaag gcagcttgga	480
tctgaagttg ctgagagatt ggtggagcct ttcacatcag gagtttatgc tggagatcct	540
gatcaactta gtgcagttgc agcttttcct aggggtggctg gtctcgaaga gagatacggg	600
tcattattcg ctggtgctct tcaagctctt aggcaaagac cacagcctag tccagcagct	660
atccagcctc cacctaaaag gggacaactt ggtaatttga gacagggact ccaacagtta	720
cctgaagctc ttgcacaaaa gttgggagat tctctcagat taggttggag agctttgcaa	780
ttgaaaagag caggagagct ttattgggtt ggtttcgaaa ctccagaggg atcaagggtg	840
gttgctgcta gacaagttgt gctcgcttta cctgcatacg aagcagctgc actcttaca	900
gagttgaacc cacctgcttc tcagcttttg gcagaaatac tctatccacc tgttgctgtt	960
gtggctcttg catacccaca agaggctctc cctcagccat taagaggatt tggatcctc	1020
atccctaggt ctcaaggact tagaaccttg ggtactatat gggcttcatg tttgttcct	1080
gaaagagcac ctcaagggtta tcactcatth ctcaagtttct taggaggtgc tacagatgct	1140
gcattggcaa gaaggagagg tattcctcct atccctgctc tcagtccaga agagagagca	1200
caaataagctc acgcagagct ttctcaggtt ctcttaacca ggagagctga accagtgtat	1260
cttgagagaga ggttggtggc tagagctata ccacaataca cacttgga taggcagaga	1320
attgctcaag ttcaggctca cttggcatct caaacccctg gtatttgggt ttgcgcta	1380
tacttgatg gagtggcact cggagattgc gttagaaggg cagaggcact cgctcagcag	1440
ttgttatcac aggtgtaa	1458

<210> 4

<211> 485

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CyPPO13

<400> 4
 Met Asn Pro Ala Thr Pro Glu Pro Leu Asn Ala Glu Val Val Val Ile
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Thr Leu Ala Trp Arg Leu Gln Gln Gly
 20 25 30
 Leu Ser Ala Arg Gly Gly Ser Pro Gln Ala Val Leu Leu Ala Glu Ala
 35 40 45
 Ser Ser Arg Val Gly Gly Cys Ile Ser Thr Gln Ser Lys Asp Gly Tyr
 50 55 60
 Arg Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Thr Pro Thr Pro Ala Leu Leu
 65 70 75 80
 Asn Leu Ile Ala Glu Val Gly Leu Thr Asp Gln Leu Val Leu Ala Asp
 85 90 95
 Ala Lys Leu Pro Arg Tyr Ile Tyr Trp Glu Gly Ala Leu Leu Pro Val
 100 105 110
 Pro Leu Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Ser Arg Leu Leu Ser Val Gly
 115 120 125
 Gly Lys Leu Arg Ala Leu Gln Gly Leu Leu Gly Phe Val Pro Pro Pro
 130 135 140
 Pro Gly His Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Phe Arg Arg Gln Leu Gly
 145 150 155 160
 Ser Glu Val Ala Glu Arg Leu Val Glu Pro Phe Thr Ser Gly Val Tyr
 165 170 175
 Ala Gly Asp Pro Asp Gln Leu Ser Ala Val Ala Ala Phe Pro Arg Val
 180 185 190
 Ala Gly Leu Glu Glu Arg Tyr Gly Ser Leu Phe Ala Gly Ala Leu Gln
 195 200 205
 Ala Leu Arg Gln Arg Pro Gln Pro Ser Pro Ala Ala Ile Gln Pro Pro
 210 215 220
 Pro Lys Arg Gly Gln Leu Gly Asn Leu Arg Gln Gly Leu Gln Gln Leu
 225 230 235 240
 Pro Glu Ala Leu Ala Gln Lys Leu Gly Asp Ser Leu Arg Leu Gly Trp
 245 250 255
 Arg Ala Leu Gln Leu Lys Arg Ala Gly Glu Leu Tyr Trp Val Gly Phe
 260 265 270
 Glu Thr Pro Glu Gly Ser Arg Trp Val Ala Ala Arg Gln Val Val Leu

36300

275 280 285
 Ala Leu Pro Ala Tyr Glu Ala Ala Ala Leu Leu Gln Glu Leu Asn Pro
 290 295 300
 Pro Ala Ser Gln Leu Leu Ala Glu Ile Leu Tyr Pro Pro Val Ala Val
 305 310 315 320
 Val Ala Leu Ala Tyr Pro Gln Glu Ala Leu Pro Gln Pro Leu Arg Gly
 325 330 335
 Phe Gly His Leu Ile Pro Arg Ser Gln Gly Leu Arg Thr Leu Gly Thr
 340 345 350
 Ile Trp Ala Ser Cys Leu Phe Pro Glu Arg Ala Pro Gln Gly Tyr His
 355 360 365
 Ser Phe Leu Ser Phe Leu Gly Gly Ala Thr Asp Ala Ala Leu Ala Arg
 370 375 380
 Arg Arg Gly Ile Pro Pro Ile Pro Ala Leu Ser Pro Glu Glu Arg Ala
 385 390 395 400
 Gln Ile Ala His Ala Glu Leu Ser Gln Val Leu Leu Thr Arg Arg Ala
 405 410 415
 Glu Pro Val Tyr Leu Gly Glu Arg Leu Trp Pro Arg Ala Ile Pro Gln
 420 425 430
 Tyr Thr Leu Gly His Arg Gln Arg Ile Ala Gln Val Gln Ala His Leu
 435 440 445
 Ala Ser Gln Thr Pro Gly Ile Trp Val Cys Ala Asn Tyr Leu Asp Gly
 450 455 460
 Val Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg Arg Ala Glu Ala Leu Ala Gln Gln
 465 470 475 480
 Leu Leu Ser Gln Val
 485

 <210> 5
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

 <220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(537)
 <223> AtPPO1 kiểu dại

 <400> 5
 Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
 20 25 30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
 35 40 45
 Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
 85 90 95
 Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
 100 105 110
 Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
 115 120 125
 Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
 130 135 140
 Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
 145 150 155 160
 Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
 180 185 190
 Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
 195 200 205
 Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
 210 215 220
 Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
 225 230 235 240
 Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
 245 250 255
 Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
 260 265 270
 Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
 275 280 285
 Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
 290 295 300
 Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
 305 310 315 320
 Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
 325 330 335
 Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
 340 345 350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
 355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
 370 375 380

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
 405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
 420 425 430

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
 435 440 445

Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
 450 455 460

Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
 465 470 475 480

Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
 485 490 495

Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
 500 505 510

Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
 515 520 525

Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

<210> 6
 <211> 1614
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1614)
 <223> AtPPO1 kiểu dại

<400> 6 60
 atggagttat ctcttctccg tccgacgact caatcgcttc ttccgtcggtt ttcgaagccc
 aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccggtt gttcagtggtc cgggtggacca 120
 accgtcggat cttcaaaaat cgaaggcgga ggaggcacca ccatcacgac ggatttgtgtg 180
 attgtcggcg gaggtattag tggctcttgc atcgctcagg cgcttgctac taagcatcct 240
 gatgctgctc cgaatttaat tgtgaccgag gctaaggatc gtgttgaggg caacattatc 300
 actcgtgaag agaatggttt tctctgggaa gaagggtcca atagttttca accgtctgat 360

```

cctatgctca ctatggtggt agatagtggt ttgaaggatg atttggtggt gggagatcct      420
actgcgccaa ggtttgtggt gtggaatggg aaattgaggg cggttccatc gaagctaaca      480
gacttacctg tctttgattt gatgagtatt ggtgggaaga ttagagctgg ttttggtgca      540
cttggcattc gaccgtcacc tccaggtcgt gaagaatctg tggaggagtt tgtacggcgt      600
aacctcgggtg atgagggtttt tgagcgcttg attgaaccgt tttgttcagg tgtttatgct      660
gggtgatcctt caaaactgag catgaaagca gcgtttggga aggtttggaa actagagcaa      720
aatggtggaa gcataatagg tgggtactttt aaggcaattc aggagaggaa aaacgctccc      780
aaggcagaac gagacccgcg cctgccaaaa ccacagggcc aaacagttgg ttctttcagg      840
aagggacttc gaatgttgcc agaagcaata tctgcaagat taggtagcaa agttaagttg      900
tcttggaagc tctcaggtat cactaagctg gagagcggag gatacaactt aacatatgag      960
actccagatg gtttagtttc cgtgcagagc aaaagtgttg taatgacggg gccatctcat     1020
gttgcaagtg gtctcttgcg ccctctttct gaatctgctg caaatgcact ctcaaaacta     1080
tattaccac cagttgcagc agtatctatc tcgtaccga aagaagcaat ccgaacagaa     1140
tgtttgatag atggtgaact aaagggtttt gggcaattgc atccacgcac gcaaggagtt     1200
gaaacattag gaactatcta cagctcctca ctctttccaa atcgcgccacc gcccggaaga     1260
atthttgctgt tgaactacat tggcgggtct acaaaccg gaattctgtc caagtctgaa     1320
ggtgagttag tggaagcagt tgacagagat ttgaggaaaa tgctaattaa gctaattcg     1380
accgatccac ttaaattagg agttagggta tggcctcaag ccattcctca gtttctagtt     1440
ggtcactttg atatccttga cacggctaaa tcatctctaa cgtcttcggg ctacgaaggg     1500
ctatthtttg gtggcaatta cgtcgctggt gtagccttag gccggtgtgt agaaggcgca     1560
tatgaaaccg cgattgaggt caacaacttc atgtcacggg acgcttacia gtaa           1614

```

```

<210>      7
<211>      537
<212>      PRT
<213>      Trình tự nhân tạo

<220>
<223>      AtPPO1 kiểu đột biến

```

```

<400>      7
Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
  1              5              10              15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
      20              25              30

```


Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
 35 40 45
 Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
 85 90 95
 Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
 100 105 110
 Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
 115 120 125
 Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
 130 135 140
 Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
 145 150 155 160
 Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
 165 170 175
 Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
 180 185 190
 Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
 195 200 205
 Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
 210 215 220
 Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
 225 230 235 240
 Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
 245 250 255
 Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
 260 265 270
 Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
 275 280 285
 Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
 290 295 300
 Leu Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
 305 310 315 320
 Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
 325 330 335
 Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
 340 345 350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
 355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
 370 375 380

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
 385 390 395 400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
 405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Met Ile Gly Gly Ser Thr Asn
 420 425 430

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
 435 440 445

Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
 450 455 460

Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
 465 470 475 480

Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
 485 490 495

Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
 500 505 510

Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
 515 520 525

Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

<210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPP010co_BamHI

<400> 8
 ccccgatcc atgattgaag tggatgtggc

30

<210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPP010co_XhoI

<400> 9

ccccctcgag tgattgtcca ccagcgaggt

30

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPP013co_BamHI

<400> 10

ccccgatcc atgaaccctg ctaccctga

30

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPP013co_XhoI

<400> 11

ccccctcgag cacctgtgat aacaactgct

30

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPP010co_XbaI

<400> 12

cccctctaga atgattgaag tggatgtggc

30

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPP010co_XhoI

<400> 13

ccccctcgag tgattgtcca ccagcgaggt

30

<210> 14

<211> 29

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi F đối với CyPP013co_XbaI

<400> 14
 ccctctagaa tgaaccctgc taccctga 29

<210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi R đối với CyPP013co_XhoI

<400> 15
 cccctcgag cacctgtgat aacaactgct 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi F đối với CyPP010_F360M

<400> 16
 gtttttacct ctatgatagg aggtgctact 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi R đối với CyPP010_F360M

<400> 17
 agcacctcct atcatagagg taaaaacctg 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi F đối với CyPP010_F360V

<400> 18
 gtttttacct ctgttatagg aggtgctact 30

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_F360V

<400> 19
 agcacctcct ataacagagg taaaaacctg 30

<210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_F360I

<400> 20
 gtttttacct ctattatagg aggtgctact 30

<210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_F360I

<400> 21
 agcacctcct ataatagagg taaaaacctg 30

<210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_F360T

<400> 22
 gtttttacct ctactatagg aggtgctact 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_F360T

<400>	23		
		agctccacca atagtagagg taaaaacctg	30
<210>	24		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi F đối với CyPPO10_F360L		
<400>	24		
		gtttttacct ctcttatagg aggtgctact	30
<210>	25		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi R đối với CyPPO10_F360L		
<400>	25		
		agctccacca ataagagagg taaaaacctg	30
<210>	26		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi F đối với CyPPO10_F360C		
<400>	26		
		gtttttacct cttgtatagg aggtgctact	30
<210>	27		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi R đối với CyPPO10_F360C		
<400>	27		
		agctccacca atacaagagg taaaaacctg	30
<210>	28		
<211>	30		
<212>	ADN		

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_A167C

<400> 28

tcaggagtgt actgtggaga tcctcaacag

30

<210> 29

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_A167C

<400> 29

ttgaggatct ccacagtaca ctcctgaaac

30

<210> 30

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_A167L

<400> 30

tcaggagtgt accttggaga tcctcaacag

30

<210> 31

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_A167L

<400> 31

ttgaggatct ccaaggtaca ctcctgaaac

30

<210> 32

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_P303L+V305L

<400> 32

ataccttatac ttactcttgc ttgtgttg

30

<210> 33
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_P303L+V305L

 <400> 33
 aacacaagca agagtaagat aaggatat 27

 <210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_V305M

 <400> 34
 ccttatccaa ctatggcttg tgttgtgctt 30

 <210> 35
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_V305M

 <400> 35
 cacaacacaa gccatagttg gataaggtat 30

 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_N59T

 <400> 36
 gagcttggtc caactagttt cgctc 25

 <210> 37
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_N59T

<400> 37

agcgaaacta gttggaccaa gctccca

27

<210> 38

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_R89A

<400> 38

caccttccag cttatatata ctggagggga

30

<210> 39

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_R89A

<400> 39

gtatatataa gctggaaggt gcctatctcc

30

<210> 40

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_V165S

<400> 40

gtttcaggat catacgctgg agatcctcaa cag

33

<210> 41

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_V165S

<400> 41

tccagcgat gatcctgaaa caaatgggtgc cac

33

<210> 42

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

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_V305T

 <400> 42
 ccttatccaa ctactgcttg tgttgctgctt 30

 <210> 43
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_V305T

 <400> 43
 cacaacacaa gcagtagttg gataaggtat 30

 <210> 44
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_S60T

 <400> 44
 ggtccaaaca ctttcgctcc tactccagca ctc 33

 <210> 45
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_S60T

 <400> 45
 aggagcgaaa gtgtttggac caagctccca cac 33

 <210> 46
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_I340T

<400> 46
 ctcggaacca cctggtcttc atgcttattc cca 33

<210> 47
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_I340T

<400> 47
 tgaagaccag gtggttccga gtgtccttat acc 33

<210> 48
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_R89L

<400> 48
 caccttcac tttatatata ctggagggga 30

<210> 49
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_R89L

<400> 49
 gtatatataa agtggaaggt gcctatctcc 30

<210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_R89V

<400> 50
 caccttcag tttatatata ctggagggga 30

<210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_R89V

<400> 51
 gtatatataa actggaaggt gcctatctcc 30

<210> 52
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_F161A

<400> 52
 agattggtgg caccagcagt ttcaggagtg tac 33

<210> 53
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_F161A

<400> 53
 gtacactcct gaaactgctg gtgccaccaa tct 33

<210> 54
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_V165C

<400> 54
 ccatttggtt caggatgcta cgctggagat cct 33

<210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_V165C

<400> 55
 aggatctcca gcgtagcatc ctgaaacaaa tgg 33

<210> 56
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_Q184G

<400> 56
 tttagaagga ttgctggact tgagaagttg gga 33

<210> 57
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_Q184G

<400> 57
 tcccaacttc tcaagtccag caatccttct aaa 33

<210> 58
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_F324V

<400> 58
 tcagttagac ctggagttgg tgttttggtg cct 33

<210> 59
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_F324V

<400> 59
 aggcaccaaaa acaccaactc caggtctaac tga 33

<210> 60
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_L327T

<400> 60 33
cctggatttg gtggtaccgt gcctagagga caa

<210> 61
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_L327T

<400> 61 33
ttgtcctcta ggcacggtaa caccaaattcc agg

<210> 62
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_A167I

<400> 62 30
tcaggagtgt acattggaga tcctcaacag

<210> 63
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_A167I

<400> 63 30
ttgaggatct ccaatgtaca ctcttgaaac

<210> 64
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_I408R

<400> 64 33
agaagggctc gtccacaata tatcgttggt tac

<210> 65
<211> 30

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_I408R

 <400> 65
 tattgtggac gagcccttct ccaaaccttc 30

 <210> 66
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO10_I408W

 <400> 66
 ggtttggaga agggcttggc cacaatatat cgttgg 36

 <210> 67
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO10_I408W

 <400> 67
 ccaacgatat attgtggcca agcccttctc caaacc 36

 <210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPPO13_F373M

 <400> 68
 tcattttotca gtatgttagg aggtgctaca 30

 <210> 69
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPPO13_F373M

 <400> 69

agcacctcct aacatactga gaaatgagtg

30

<210> 70
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi F đối với CyPP013_F373V

<400> 70
 tcattttctca gtgttttagg aggtgctaca

30

<210> 71
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi R đối với CyPP013_F373V

<400> 71
 agcacctcct aaaacactga gaaatgagtg

30

<210> 72
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPP013_F373I

<400> 72
 tcattttctca gtatttttagg aggtgctaca

30

<210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPP013_F373I

<400> 73
 agcacctcct aaaatactga gaaatgagtg

30

<210> 74
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F đối với CyPPO13_F373T

<400> 74
 tcattttctca gtacttttagg aggtgctaca 30

<210> 75
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R đối với CyPPO13_F373T

<400> 75
 agcacctcct aaagtactga gaaatgagtg 30

<210> 76
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F đối với CyPPO13_F373L

<400> 76
 tcattttctca gtcttttagg aggtgctaca 30

<210> 77
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R đối với CyPPO13_F373L

<400> 77
 agcacctcct aaaagactga gaaatgagtg 30

<210> 78
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F đối với CyPPO13_F373C

<400> 78
 tcattttctca gttgttttagg aggtgctaca 30

<210> 79
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_F373C

<400> 79
 agcacctcct aaacaactga gaaatgagtg 30

<210> 80
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_R101A

<400> 80
 aagttgccag catatatcta ctgggagggg gc 32

<210> 81
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_R101A

<400> 81
 agtagatata tgctggcaac tttgcatcag cc 32

<210> 82
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_A177C

<400> 82
 tcaggagttt attgtggaga tcctgatcaa 30

<210> 83
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_A177C

<400> 83
 atcaggatct ccacaataaa ctctgatgt 30

<210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_A177L

<400> 84
 tcaggagttt atcttgagaga tcctgatcaa 30

<210> 85
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_A177L

<400> 85
 atcaggatct ccaagataaa ctctgatgt 30

<210> 86
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_A177I

<400> 86
 ggagtttata ttggagatcc tgatcaactt ag 32

<210> 87
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_A177I

<400> 87
 aggatctcca atataaactc ctgatgtgaa ag 32

<210> 88
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_P316L+V318L

<400> 88

atactctatc ttcctcttgc tgttggtggct

30

<210> 89

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_P316L+V318L

<400> 89

cacaacagca agaggaagat agagtatttc

30

<210> 90

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_V318L

<400> 90

tatccacctc ttgctgttgt ggctcttgca tac

33

<210> 91

<211> 32

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_V318L

<400> 91

caacagcaag aggtggatag agtatttctg cc

32

<210> 92

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_V318M

<400> 92

ctctatccac ctatggctgt tgtggctctt

30

<210> 93
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_V318M

<400> 93
 agccacaaca gccataggtg gatagagtat 30

<210> 94
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_P316A+V318L

<400> 94
 atactctatg ctcctcttgc tgttgtggct 30

<210> 95
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_P316A+V318L

<400> 95
 cacaacagca gcaggaagat agagtatttc 30

<210> 96
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_F373N

<400> 96
 tttctcagta acttaggagg tgctacagat gc 32

<210> 97
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_F373N

<400> 97
cctcctaagt tactgagaaa tgagtgataa c 31

<210> 98
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_F373H

<400> 98
tttctcagtc acttaggagg tgctacagat gc 32

<210> 99
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_F373H

<400> 99
cctcctaagt gactgagaaa tgagtgataa c 31

<210> 100
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_G194Q

<400> 100
gcttttccta gggtaggctca gctcgaagag agatacgg 38

<210> 101
<211> 38
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_G194Q

<400> 101
ccgtatctct cttcgagctg agccacccta ggaaaagc 38

<210> 102

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

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_G194K

<400> 102
 gcttttccta ggggtggctaa actcgaagag agatacgg

38

<210> 103
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_G194K

<400> 103
 ccgtatctct cttcgagttt agccacccta ggaaaagc

38

<210> 104
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_G194R

<400> 104
 gcttttccta ggggtggctcg tctcgaagag agatacgg

38

<210> 105
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_G194R

<400> 105
 ccgtatctct cttcgagacg agccacccta ggaaaagc

38

<210> 106
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_G194E

<400> 106
 gcttttccta ggggtggctga actcgaagag agatacgg 38

<210> 107
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_G194E

<400> 107
 ccgtatctct cttcgagttc agccacccta ggaaaagc 38

<210> 108
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_G194M

<400> 108
 gcttttccta ggggtggctat gctcgaagag agatacgg 38

<210> 109
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_G194M

<400> 109
 ccgtatctct cttcgagcat agccacccta ggaaaagc 38

<210> 110
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_F337V

<400> 110
 cagccattaa gaggagtggg tcatctcatc cc 32

<210> 111
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_F337V

<400> 111 32
 gggatgagat gaccactcc tcttaatggc tg

<210> 112
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_L340T

<400> 112 33
 gaggatattgg tcataccatc cctaggtctc aag

<210> 113
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_L340T

<400> 113 33
 cttgagacct agggatggta tgaccaaata ctc

<210> 114
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_I353T

<400> 114 32
 gaaccttggg tactacctgg gcttcatggt tg

<210> 115
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_I353T

<400> 115 32
 caaacatgaa gccacggtag tacccaaggt tc

<210> 116
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_F171A

 <400> 116
 agattggtgg agcctgctac atcaggagtt tat 33

 <210> 117
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_F171A

 <400> 117
 ataaactcct gatgtagcag gctccaccaa tct 33

 <210> 118
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_R101A

 <400> 118
 gatgcaaagt tgccagctta tatctactgg gag 33

 <210> 119
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_R101A

 <400> 119
 ctcccgtag atataagctg gcaactttgc atc 33

 <210> 120
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_V175C

<400> 120
cctttcacat caggatgtta tgctggagat cct 33

<210> 121
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_V175C

<400> 121
aggatctcca gcataacatc ctgatgtgaa agg 33

<210> 122
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi F đối với CyPPO13_V175L

<400> 122
acatcaggat tgtatgctgg agatcctgat c 31

<210> 123
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi R đối với CyPPO13_V175L

<400> 123
tccagcatac aatcctgatg tgaaaggctc cac 33

<210> 124
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Forward đoạn mỗi đối với bar probe

<400> 124
ttccgtaccg agccgcagga 20

<210> 125
<211> 20

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Reverse đoạn mỗi đối với bar probe

 <400> 125
 cgttgggcag cccgatgaca 20

 <210> 126
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vị trí giới hạn của CyPPO10_BamHIF

 <400> 126
 ccccgatcc atgattgaag tggatgtggc ta 32

 <210> 127
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vị trí giới hạn của CyPPO10_XhoIR

 <400> 127
 cccctcgag tgattgtcca ccagcgaggt aag 33

 <210> 128
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vị trí giới hạn của CyPPO13_BamHIF

 <400> 128
 ccccgatcc atgaaccctg ctaccctga ac 32

 <210> 129
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Vị trí giới hạn của CyPPO13_XhoIR

 <400> 129

ccccctcgag cacctgtgat aacaactgct gag

33

<210> 130
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit nucleic của CyPP010m-6

<400> 130
 atgattgaag tggatgtggc tattgttggg ggtgggtctta gtggattgtc agtggcttgg 60
 agattacaga ggagtgtctc tcattattct ggagttcttc ttgaggcttc tgatagactt 120
 ggaggtaata tcactacaca agctgctgaa ggatttgtgt gggagcttgg tccaaacagt 180
 ttcgctccta ctccagcact cttacagttg attgctgaag ttggactcca ttctgagtta 240
 atcagaggag ataggcacct tccaagatat atatactgga ggggagaact ttatcctttg 300
 gagccaaacta ggcctcttgc tttggcaaca tcaaactctt tgagtccttg gggaaagggt 360
 agagctgcac tcggagcttt aggttttgtg cctccatctc ttggatctgg agatgaaagt 420
 gttgattctt tctttagaag gcatcttggg caagaagttg ctgagagatt ggtggcacca 480
 tttgtttcag gagtgtacgc tggagatcct caacagcttt ctgctgctgc tgctttttaga 540
 aggattgctc aacttgagaa gttgggaggt tcattgatcg ctggagcact cagattaaga 600
 aggcaacagc ctccacagcc aaaacctcca gctcaagtgc agatgagacc tggagaactc 660
 ggtagtttta gggggggtct cgctgcatta cctagagcca tcgcacaaca gttgaaggca 720
 ccacttcatt tgcaaacacc tgttgaagct attaccctg agccaaaagg aagttatctc 780
 ttaaggagtg gtgaactgac ttggcacgct agatcagttg tgttggctac tccagcatac 840
 caaactgctg aacttgttgc accattccag cctgctatcg ctagagcttt ggctaccata 900
 ccttatccaa ctgttgcttg tgttgtgctt gcttaccctg ctggattggg tagatcagtt 960
 agacctggat ttggtgtttt ggtgcctaga ggacaaggta taaggatact cggaaccatt 1020
 tggctctcat gcttattccc acaaaggact cctgctggtt ggcaggcttt tacctctatg 1080
 ataggaggtg atactgatcc tgatcttgca tcattgagag aagaggccat tgttgaacaa 1140
 gtgcaacagg atctcacaag gcttcttgat cttcctgctg caaaggcaag actcttgggt 1200
 atgaaggttt ggagaggggc tattccacaa tatacgttg gttaccctca acagaggcaa 1260
 caggtgacac acgctcttac ccagactcct ggtctcttct tatgttcaaa ctacgcagag 1320
 ggagttgcat tgggggatag agtggaacac ggaaatagga ctgctgctgc tgtggctgct 1380
 tacctcgctg gtggacaatc atga 1404

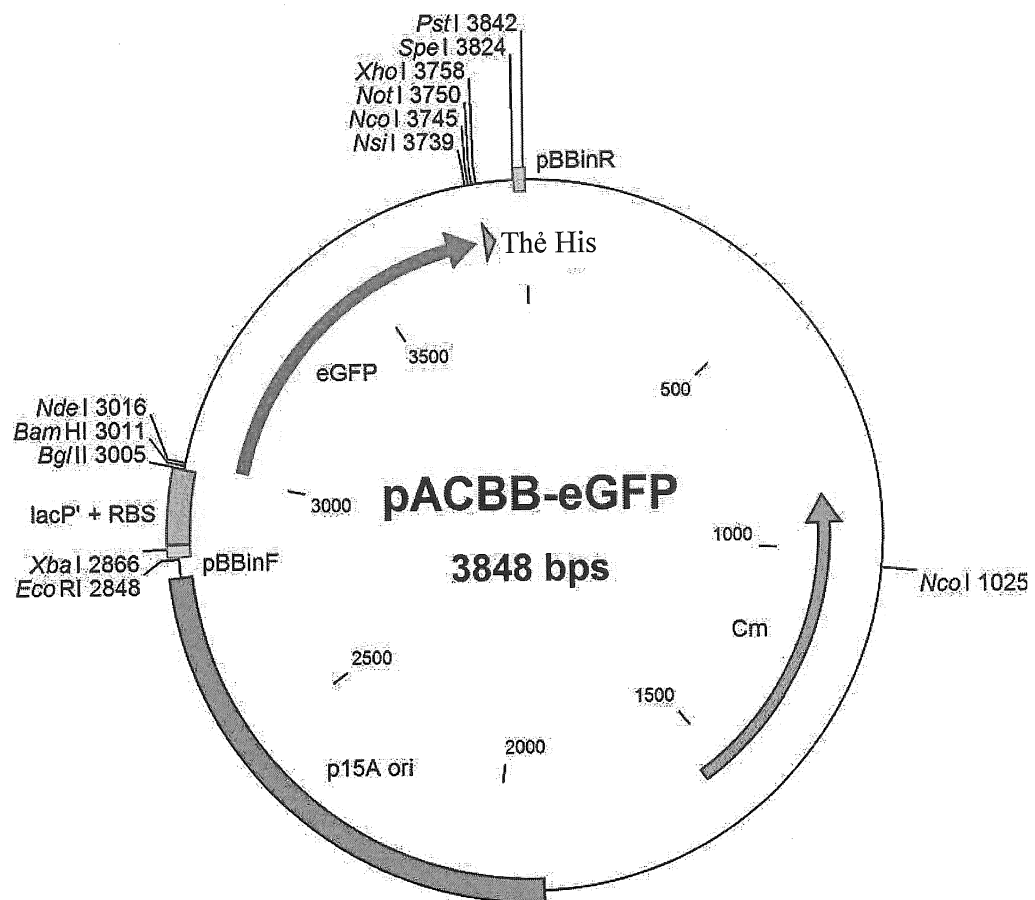
<210> 131
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> CyPP010m-6

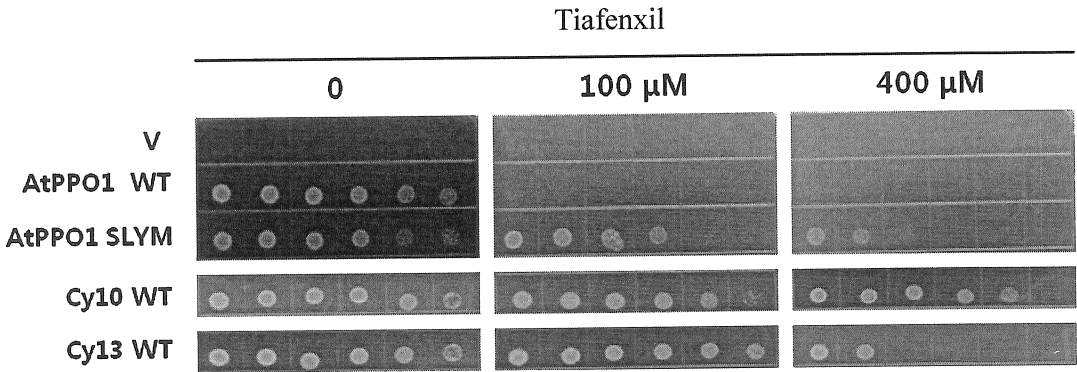
<400> 131
 Met Ile Glu Val Asp Val Ala Ile Val Gly Gly Gly Leu Ser Gly Leu
 1 5 10 15
 Ser Val Ala Trp Arg Leu Gln Arg Ser Ala Pro His Tyr Ser Gly Val
 20 25 30
 Leu Leu Glu Ala Ser Asp Arg Leu Gly Gly Asn Ile Thr Thr Gln Ala
 35 40 45
 Ala Glu Gly Phe Val Trp Glu Leu Gly Pro Asn Ser Phe Ala Pro Thr
 50 55 60
 Pro Ala Leu Leu Gln Leu Ile Ala Glu Val Gly Leu His Ser Glu Leu
 65 70 75 80
 Ile Arg Gly Asp Arg His Leu Pro Arg Tyr Ile Tyr Trp Arg Gly Glu
 85 90 95
 Leu Tyr Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu Ala Leu Ala Thr Ser Asn
 100 105 110
 Leu Leu Ser Pro Trp Gly Lys Val Arg Ala Ala Leu Gly Ala Leu Gly
 115 120 125
 Phe Val Pro Pro Tyr Leu Gly Ser Gly Asp Glu Ser Val Asp Ser Phe
 130 135 140
 Phe Arg Arg His Leu Gly Gln Glu Val Ala Glu Arg Leu Val Ala Pro
 145 150 155 160
 Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Gln Gln Leu Ser Ala Ala
 165 170 175
 Ala Ala Phe Arg Arg Ile Ala Gln Leu Glu Lys Leu Gly Gly Ser Leu
 180 185 190
 Ile Ala Gly Ala Leu Arg Leu Arg Arg Gln Gln Pro Pro Gln Pro Lys
 195 200 205
 Pro Pro Ala Gln Val Gln Met Arg Pro Gly Glu Leu Gly Ser Phe Arg
 210 215 220
 Gly Gly Leu Ala Ala Leu Pro Arg Ala Ile Ala Gln Gln Leu Lys Ala
 225 230 235 240
 Pro Leu His Leu Gln Thr Pro Val Glu Ala Ile Thr Pro Glu Pro Lys
 245 250 255

Gly Ser Tyr Leu Leu Arg Ser Gly Glu Leu Thr Trp His Ala Arg Ser
 260 265 270
 Val Val Leu Ala Thr Pro Ala Tyr Gln Thr Ala Glu Leu Val Ala Pro
 275 280 285
 Phe Gln Pro Ala Ile Ala Arg Ala Leu Ala Thr Ile Pro Tyr Pro Thr
 290 295 300
 Val Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Ala Gly Leu Gly Arg Ser Val
 305 310 315 320
 Arg Pro Gly Phe Gly Val Leu Val Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Ile
 325 330 335
 Leu Gly Thr Ile Trp Ser Ser Cys Leu Phe Pro Gln Arg Thr Pro Ala
 340 345 350
 Gly Trp Gln Ala Phe Thr Ser Met Ile Gly Gly Asp Thr Asp Pro Asp
 355 360 365
 Leu Ala Ser Leu Arg Glu Glu Ala Ile Val Glu Gln Val Gln Gln Asp
 370 375 380
 Leu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Pro Ala Ala Lys Ala Arg Leu Leu Gly
 385 390 395 400
 Met Lys Val Trp Arg Gly Ala Ile Pro Gln Tyr Ile Val Gly Tyr Pro
 405 410 415
 Gln Gln Arg Gln Gln Val Thr His Ala Leu Thr Gln Thr Pro Gly Leu
 420 425 430
 Phe Leu Cys Ser Asn Tyr Ala Glu Gly Val Ala Leu Gly Asp Arg Val
 435 440 445
 Glu His Gly Asn Arg Thr Ala Ala Ala Val Ala Ala Tyr Leu Ala Gly
 450 455 460
 Gly Gln Ser
 465

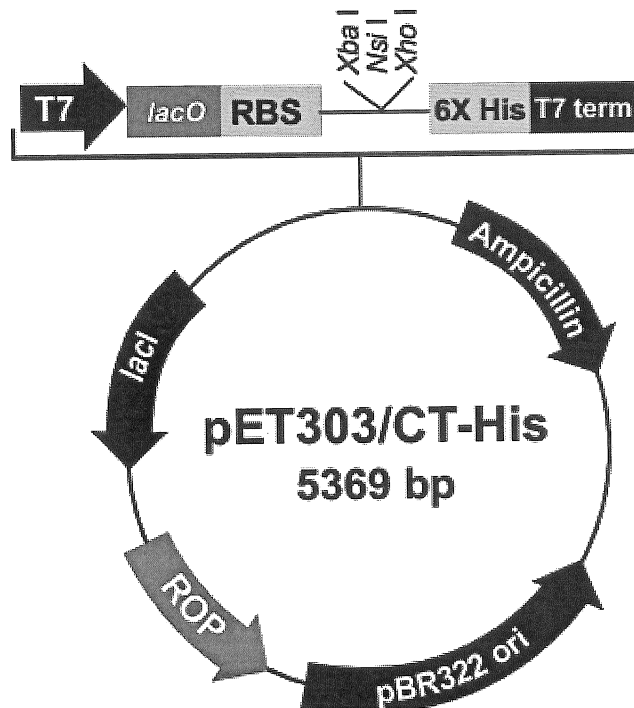
【Fig. 1】



【Fig. 2】



【Fig. 3】

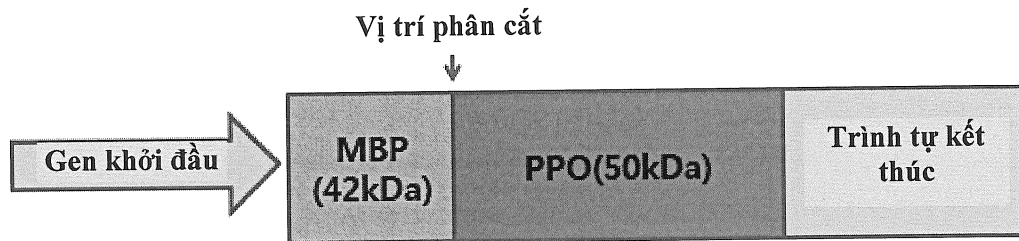


Nhận xét đối với pET303 CT-His
5369 nucleotit

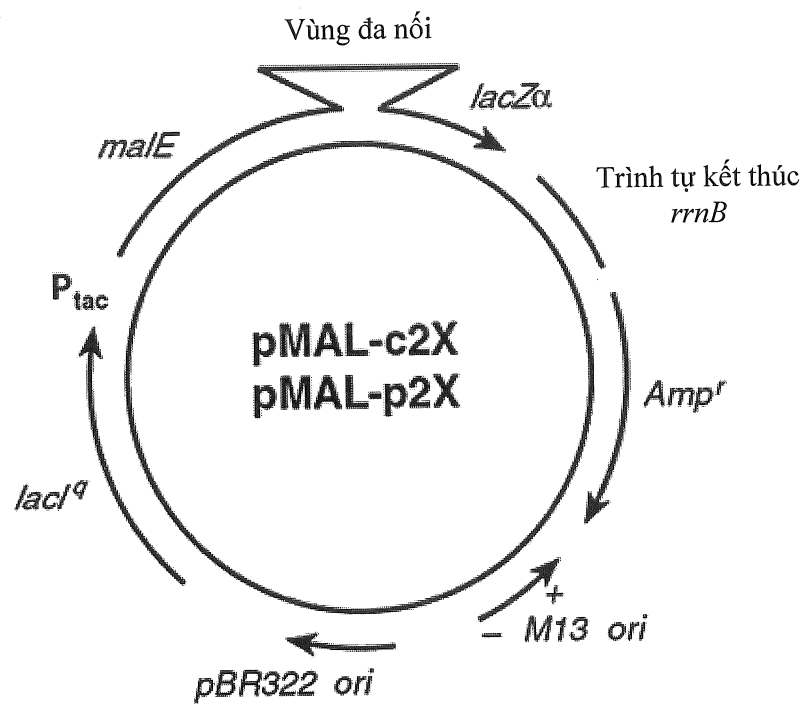
Gen khởi đầu T7: bazơ 20-36
 Vị trí mồi gen khởi đầu T7: bazơ 20-39
 Trình tự mở đầu (*lacO*): bazơ 39-63
 Vị trí liên kết ribosom (RBS): bazơ 95-100
 Thẻ 6X His: bazơ 119-136
 Vị trí mồi ngược T7: bazơ 186-206
 Vùng kết thúc phiên mã T7: bazơ 147-277
 Điểm gốc F1: bazơ 287-742
 Gen khởi đầu *bla*: bazơ 775-879
 Gen kháng ampicillin (*bla*): bazơ 874-1734
 Điểm hốc pBR322: bazơ 1945-2678 (c)
 ORF *ROP*: bazơ 2920-3011 (c)
 ORF *lacI*: bazơ 3914-5032 (c)

【Fig. 4】

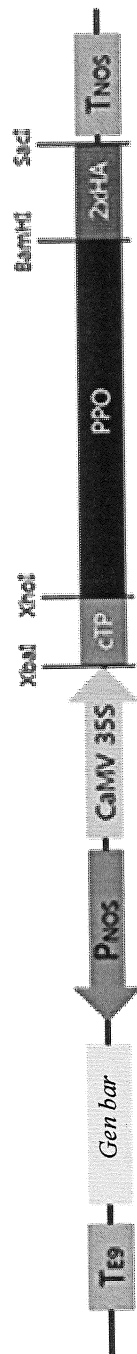
Vectơ để dung hợp protein của PPO và MBP (protein liên kết maltoza)



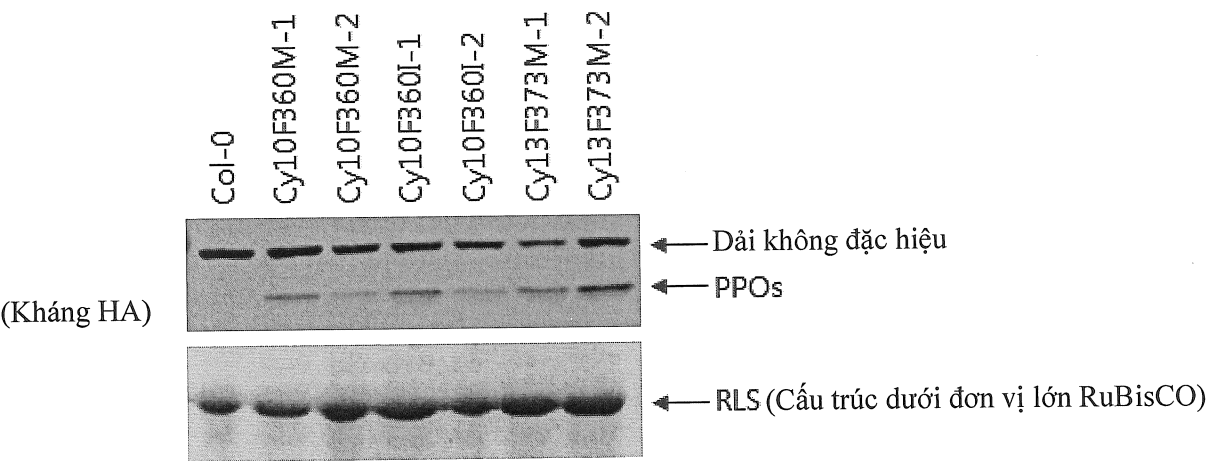
【Fig. 5】



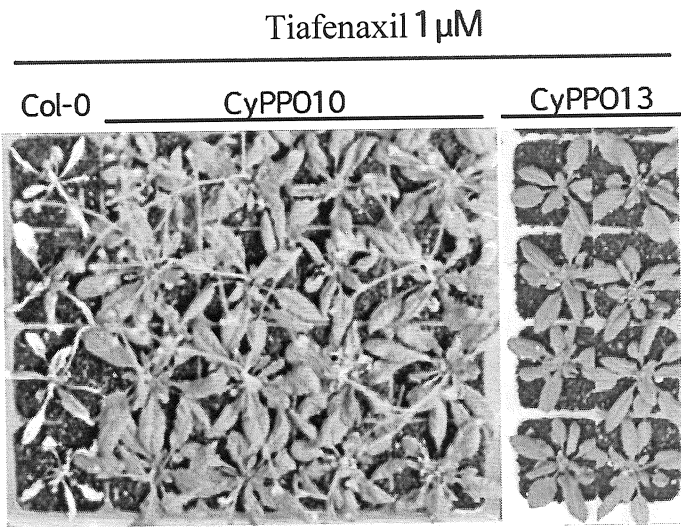
【Fig. 6】



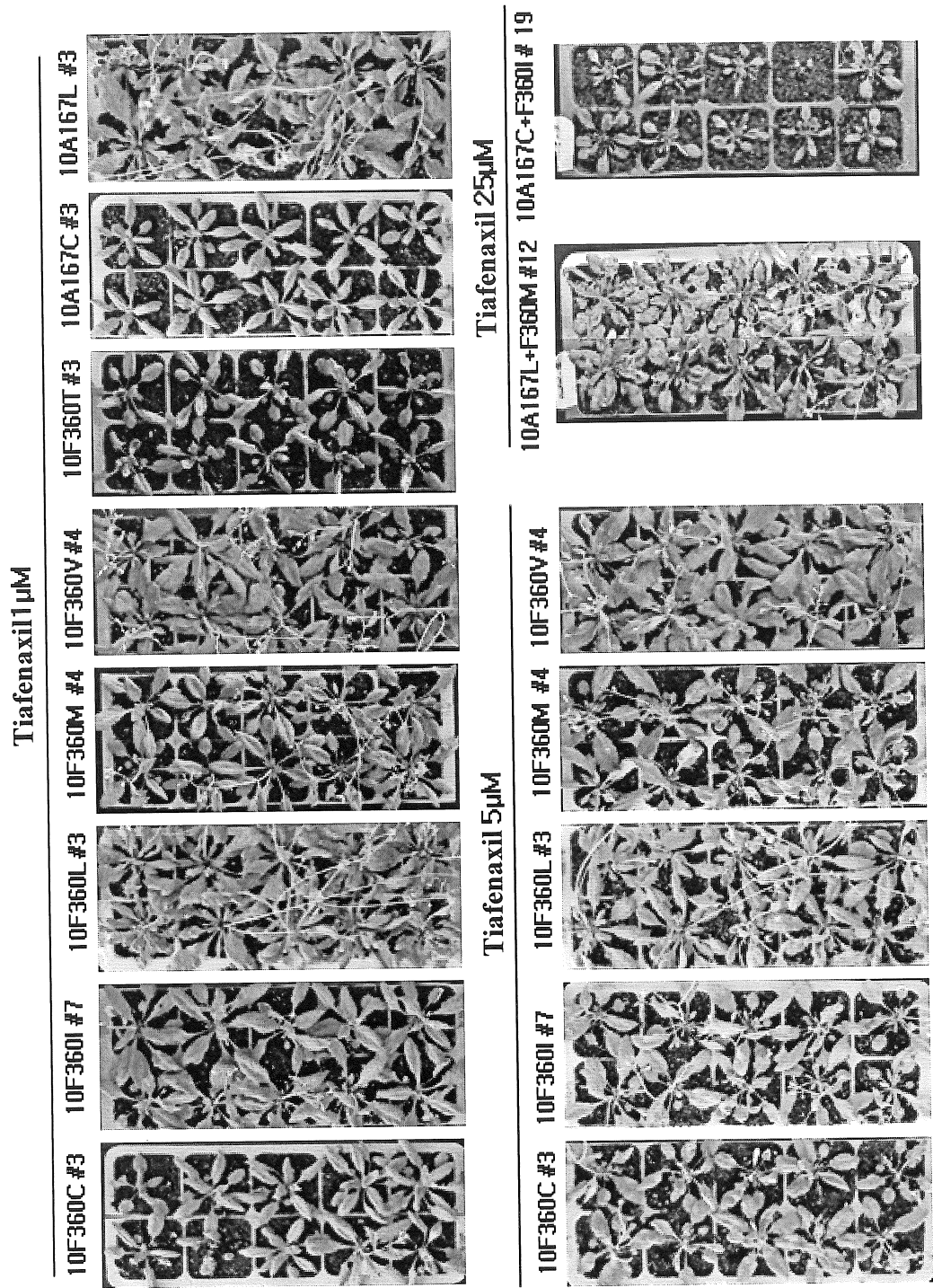
【Fig. 7】



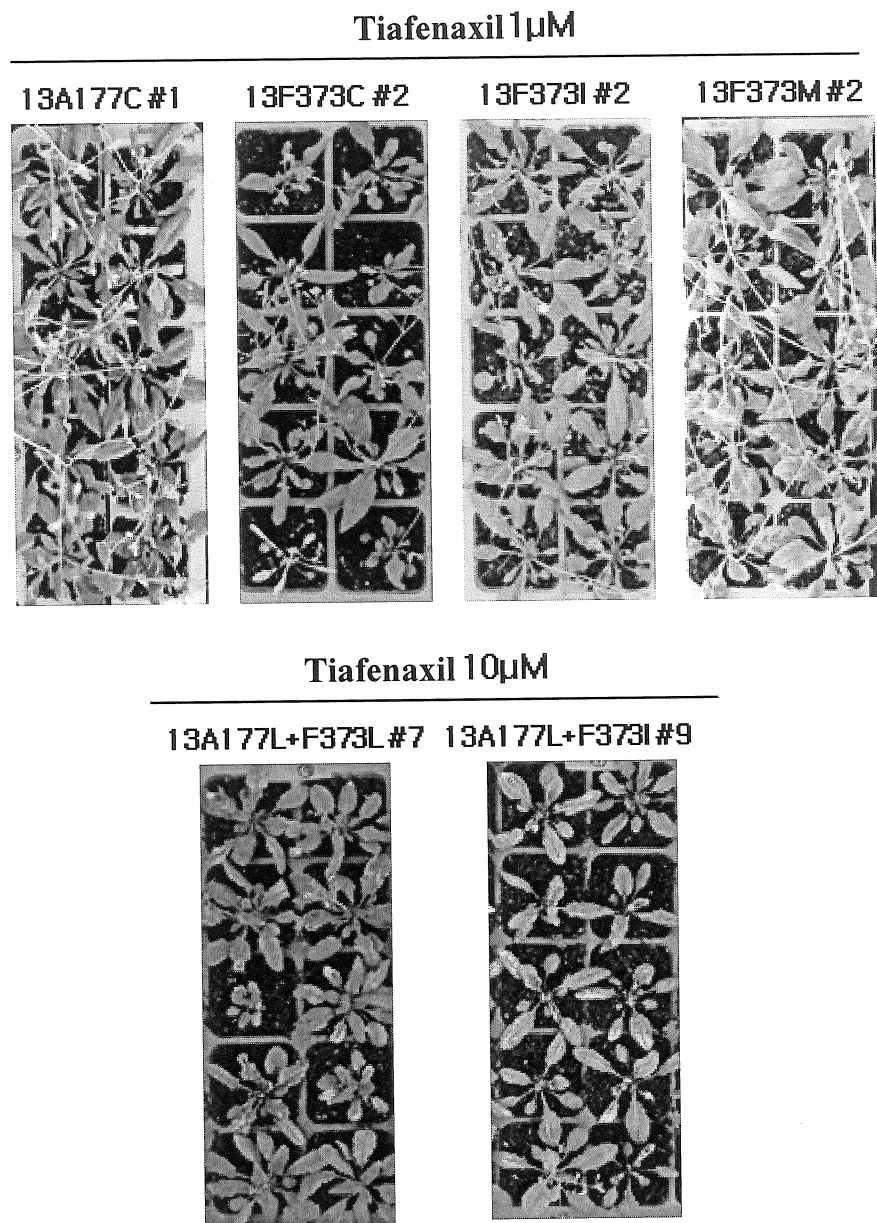
【Fig. 8】



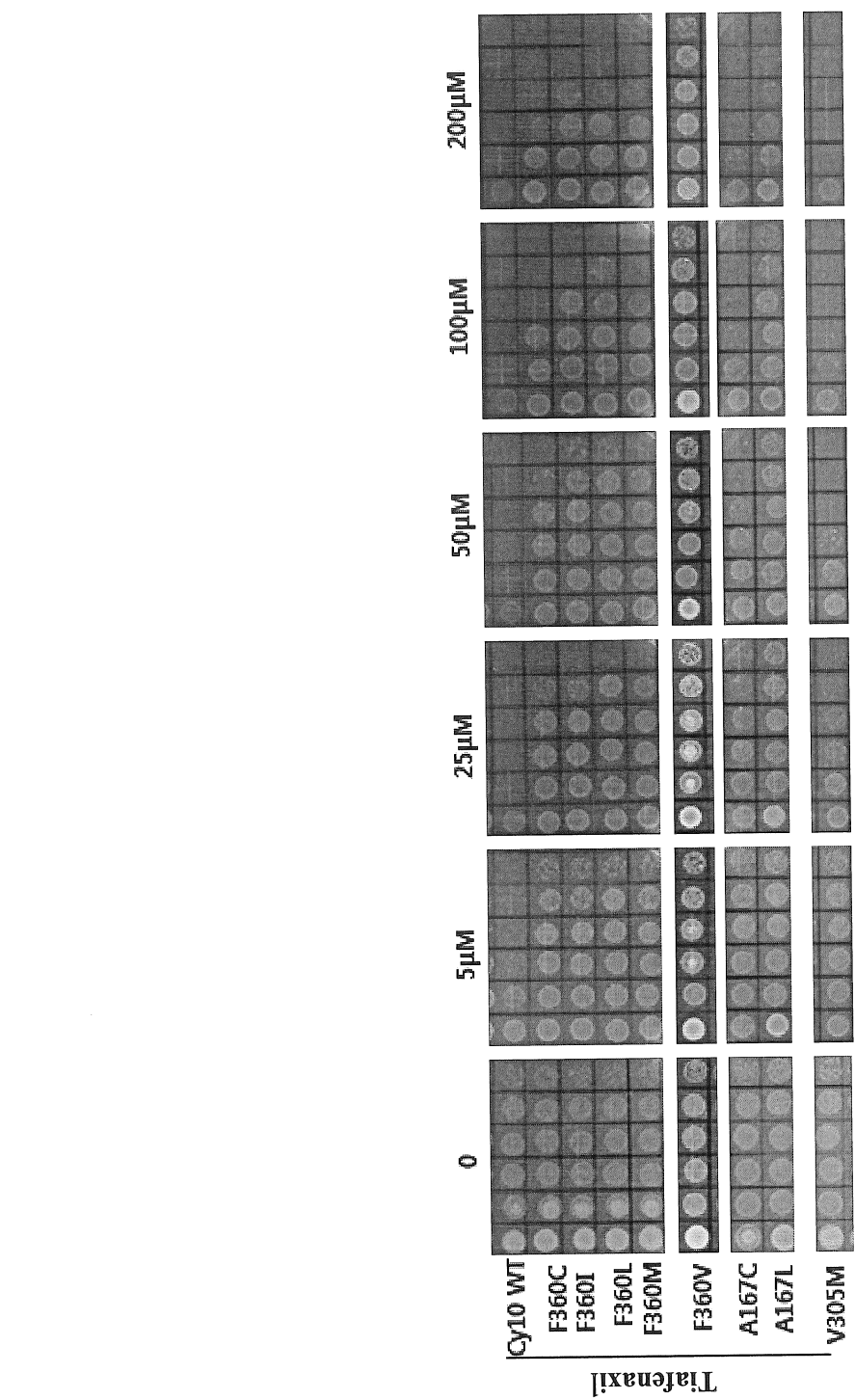
【Fig. 9】



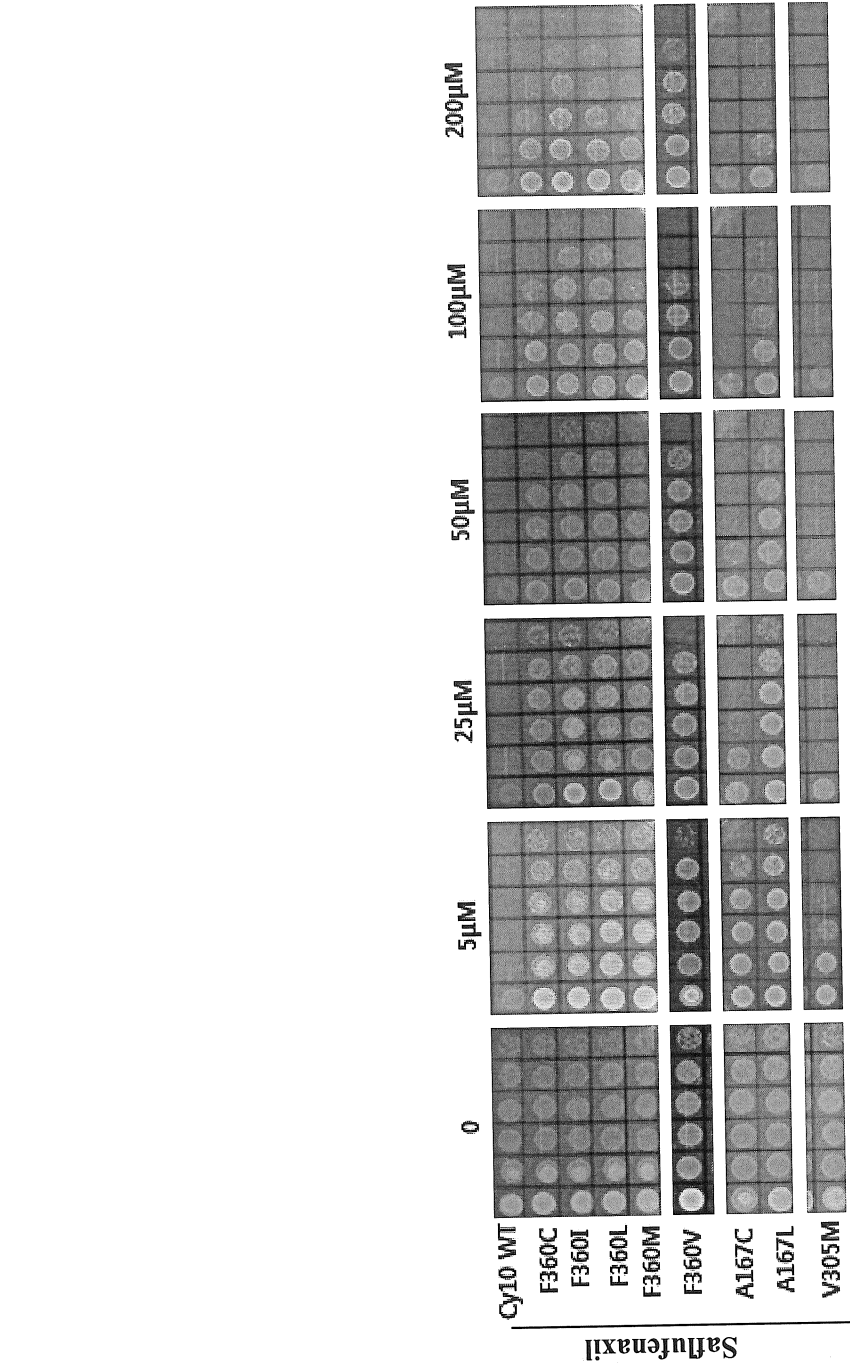
【Fig. 10】



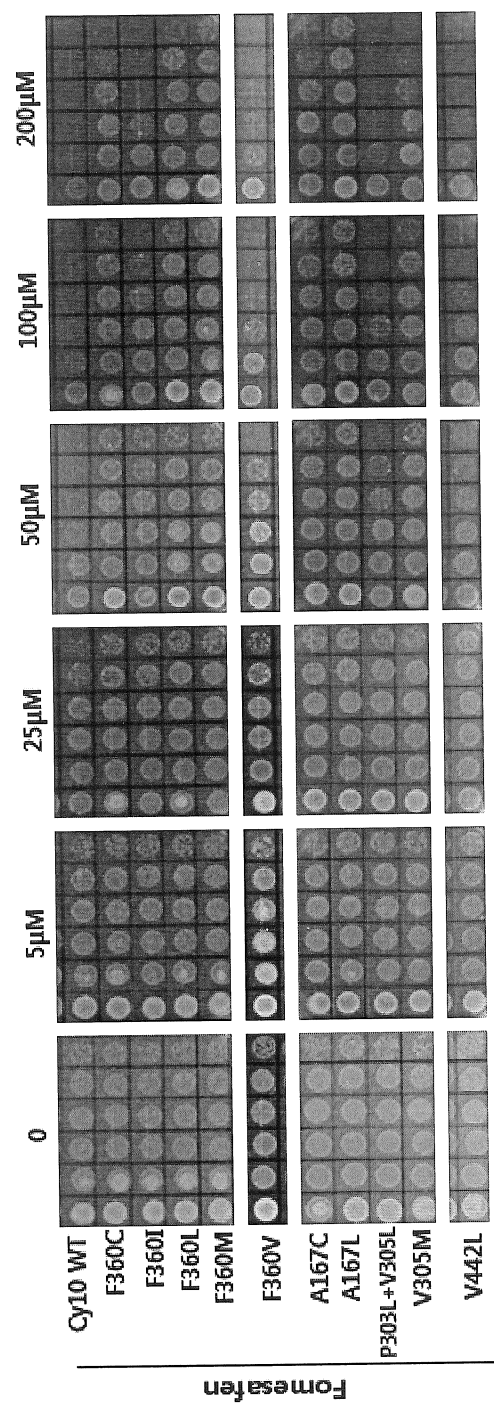
【Fig. 11】



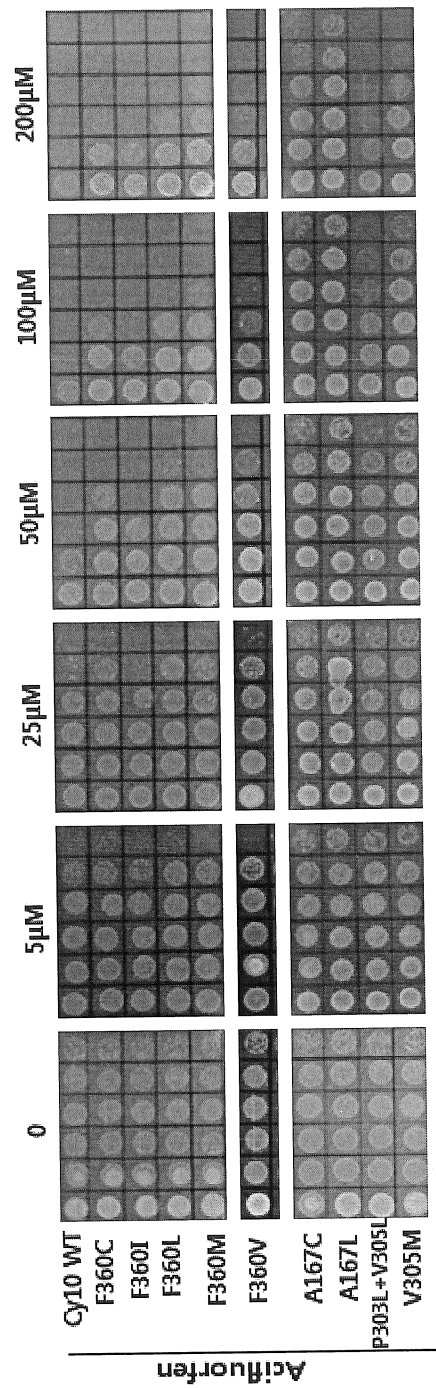
【Fig. 12】



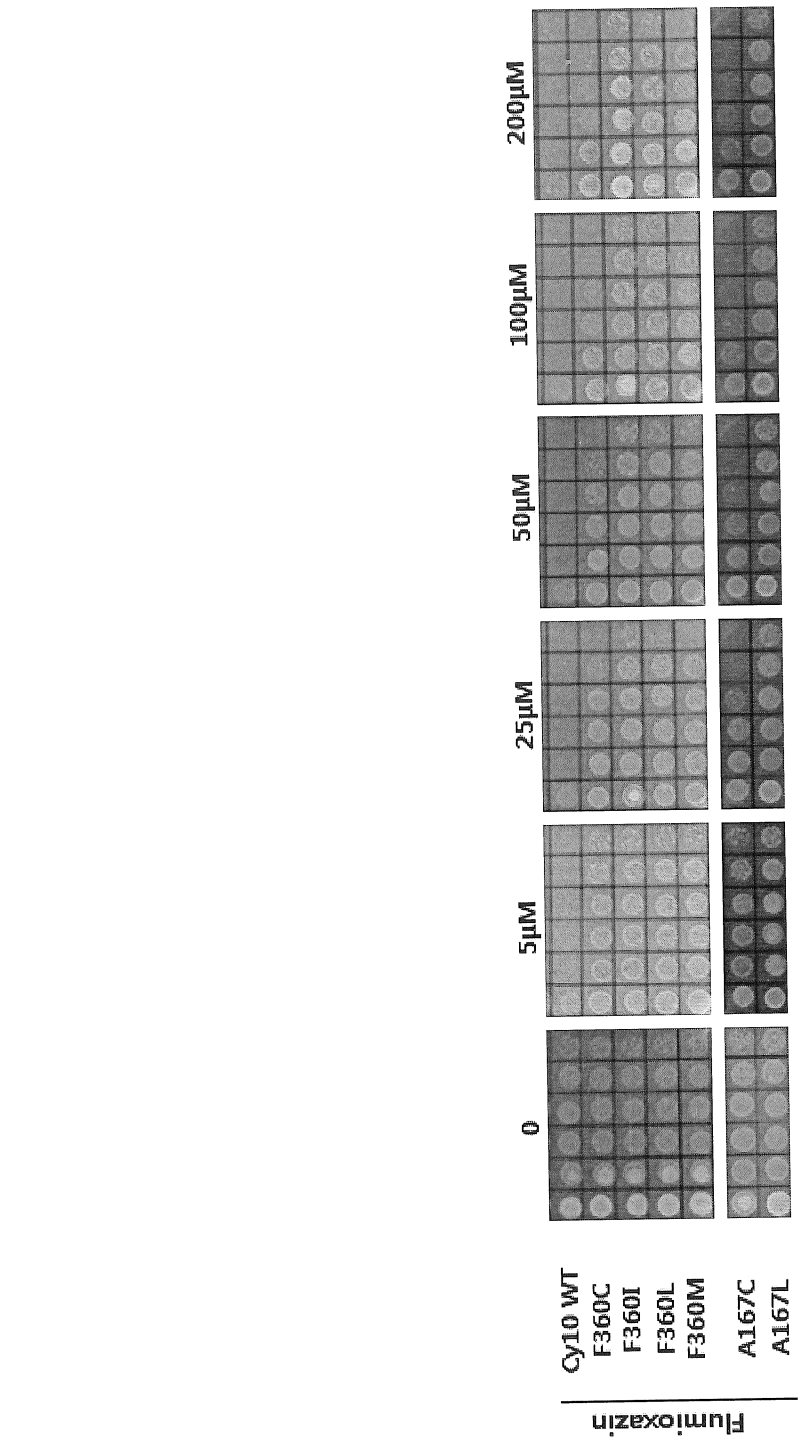
【Fig. 13】



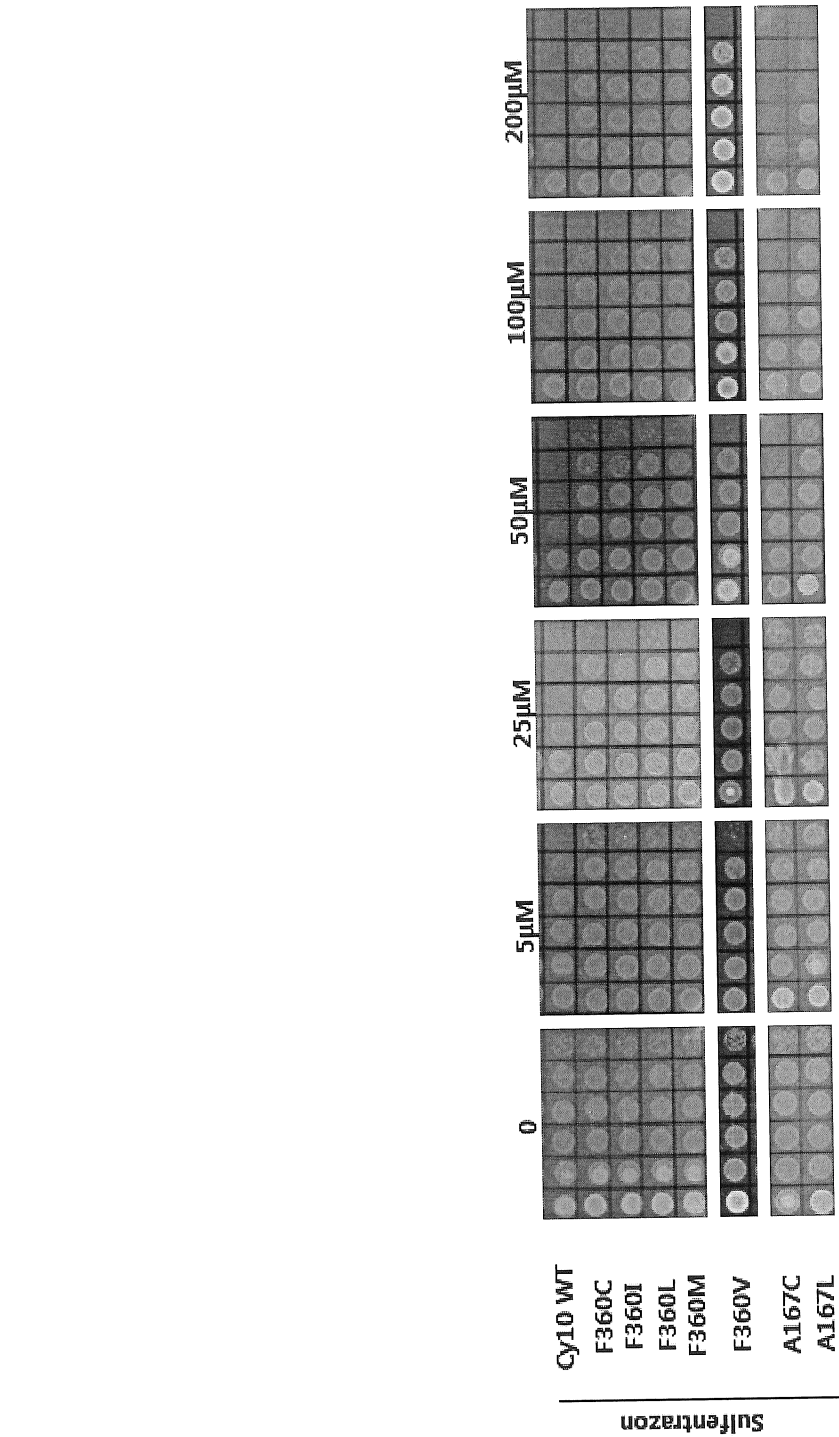
【Fig. 14】



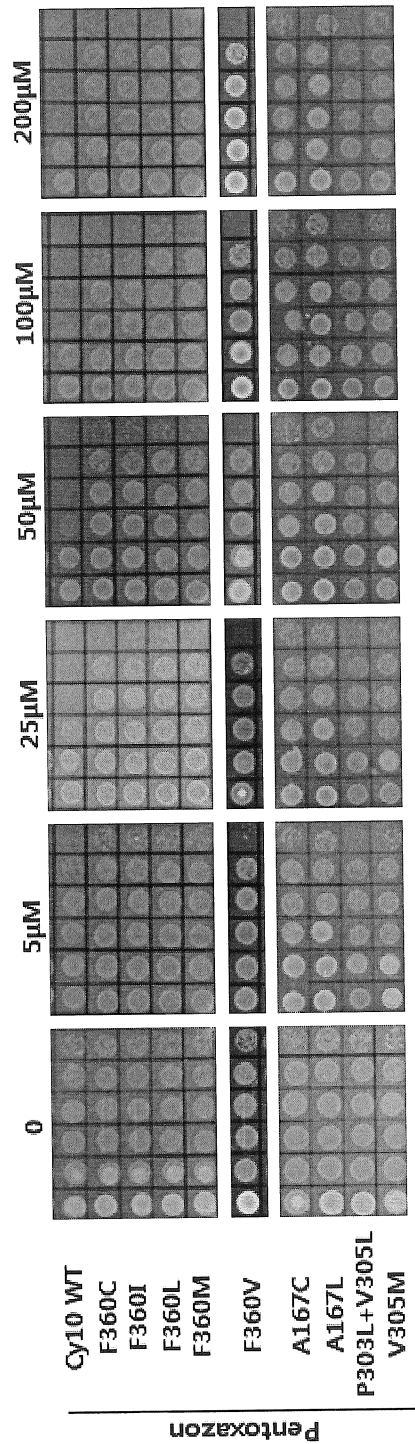
【Fig. 15】



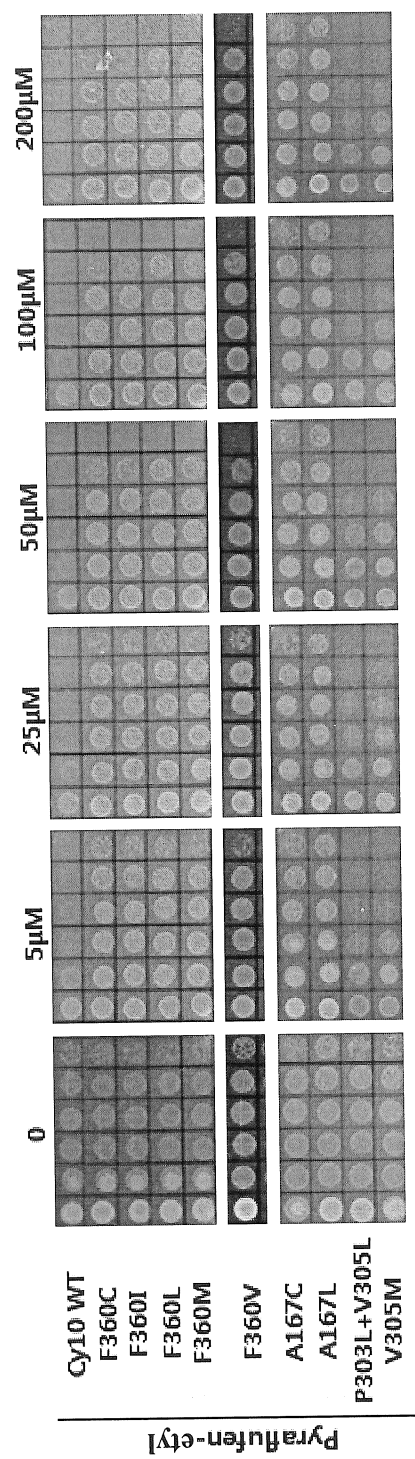
【Fig. 16】



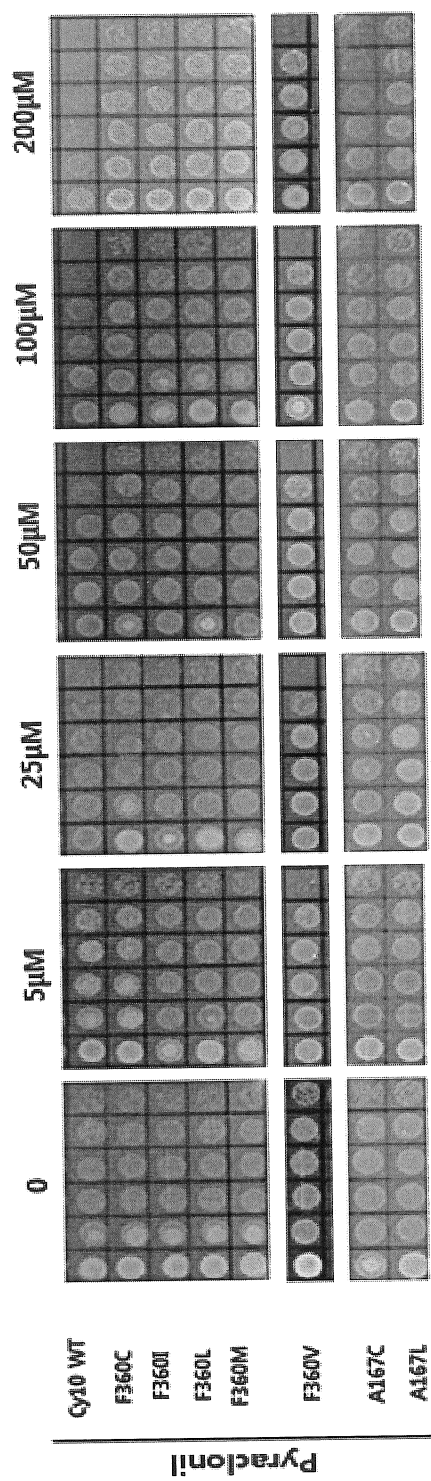
【Fig. 17】



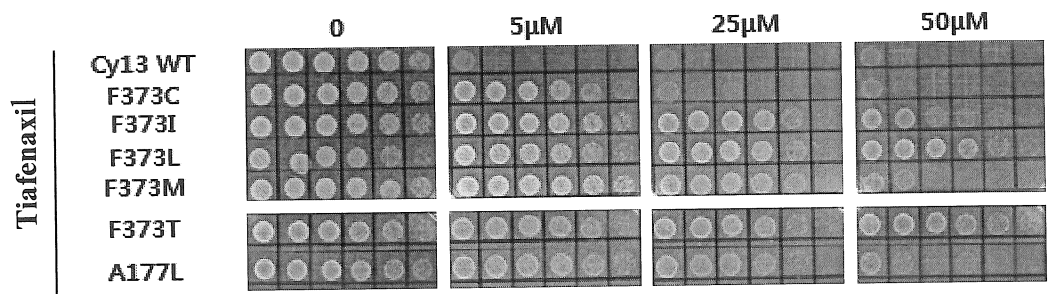
【Fig. 18】



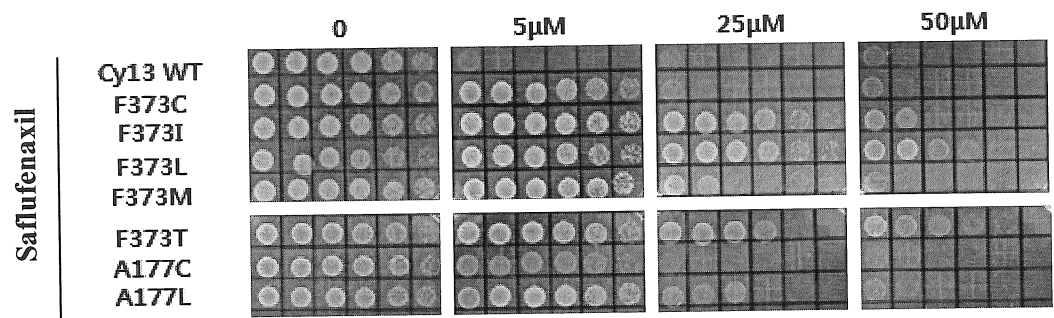
【Fig. 19】



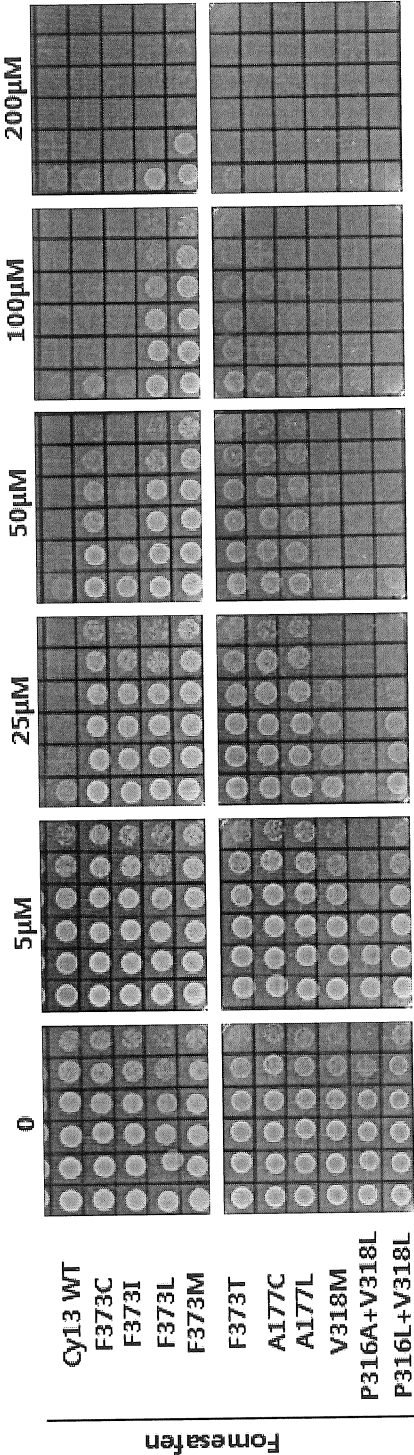
【Fig. 20】



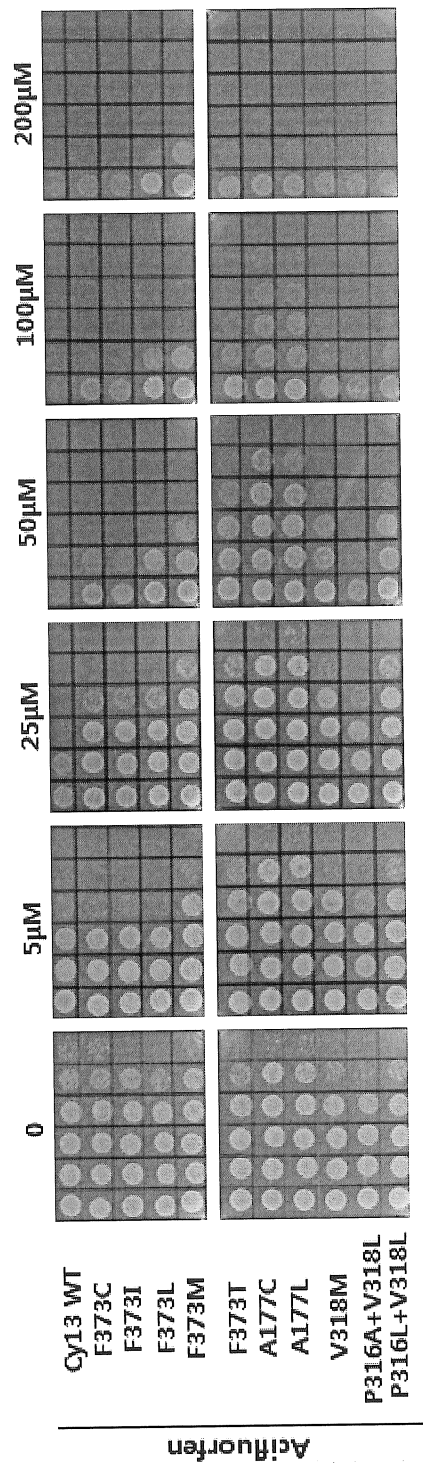
【Fig. 21】



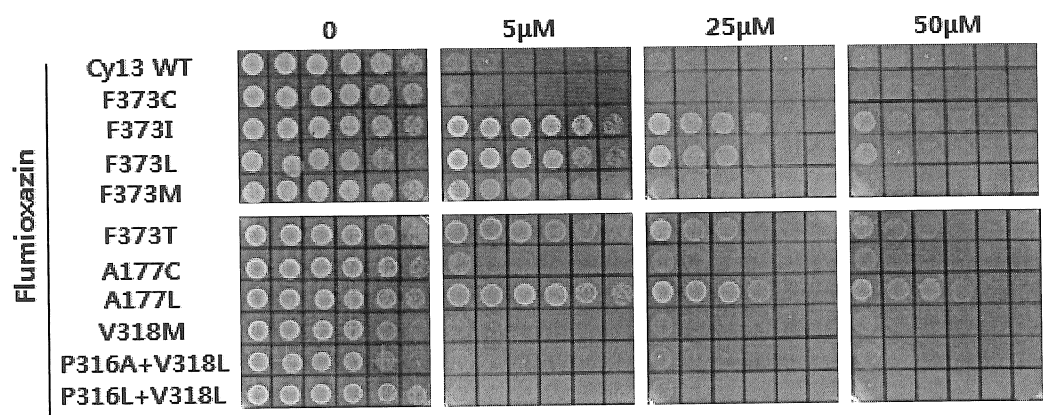
【Fig. 22】



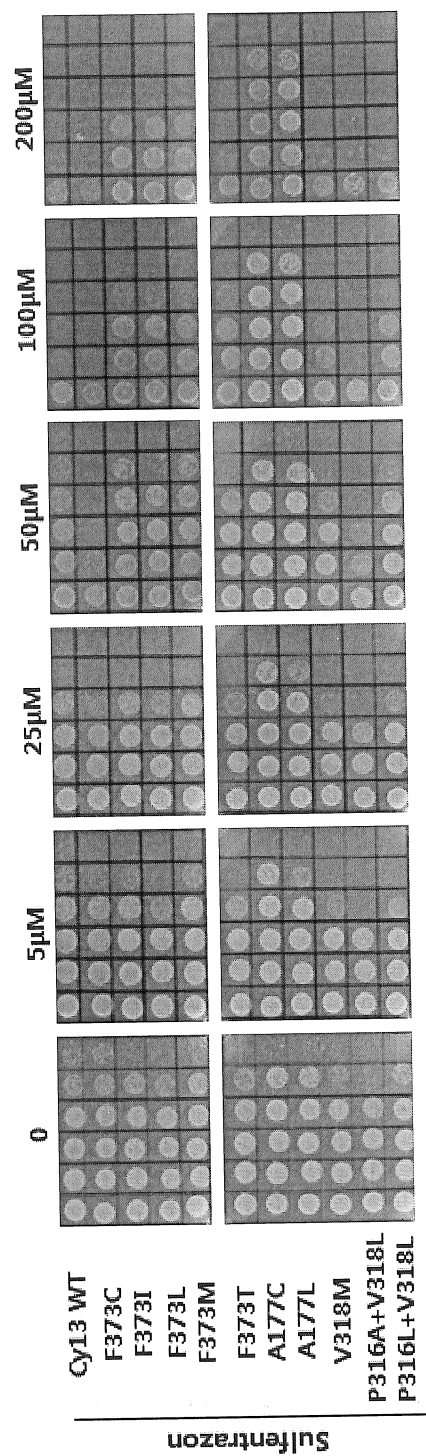
【Fig. 23】



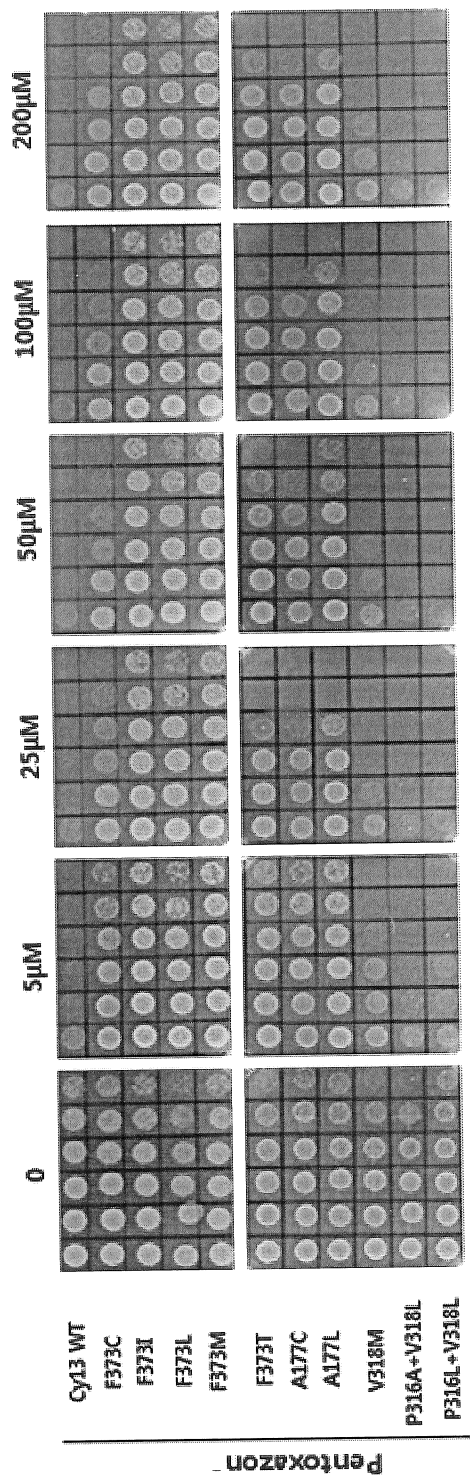
【Fig. 24】



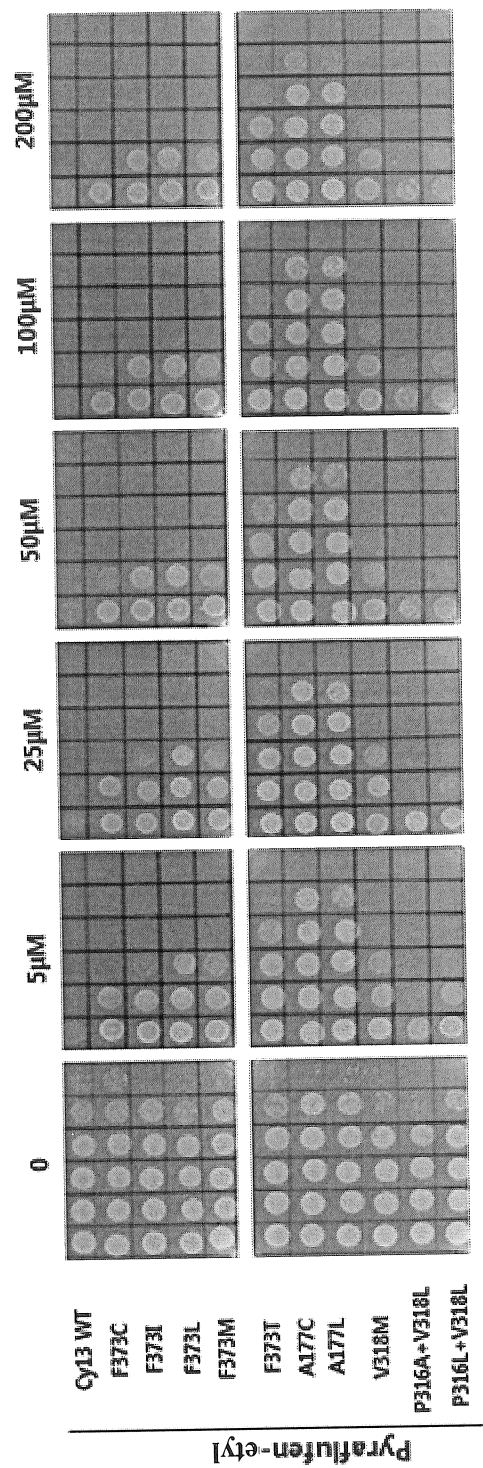
【Fig. 25】



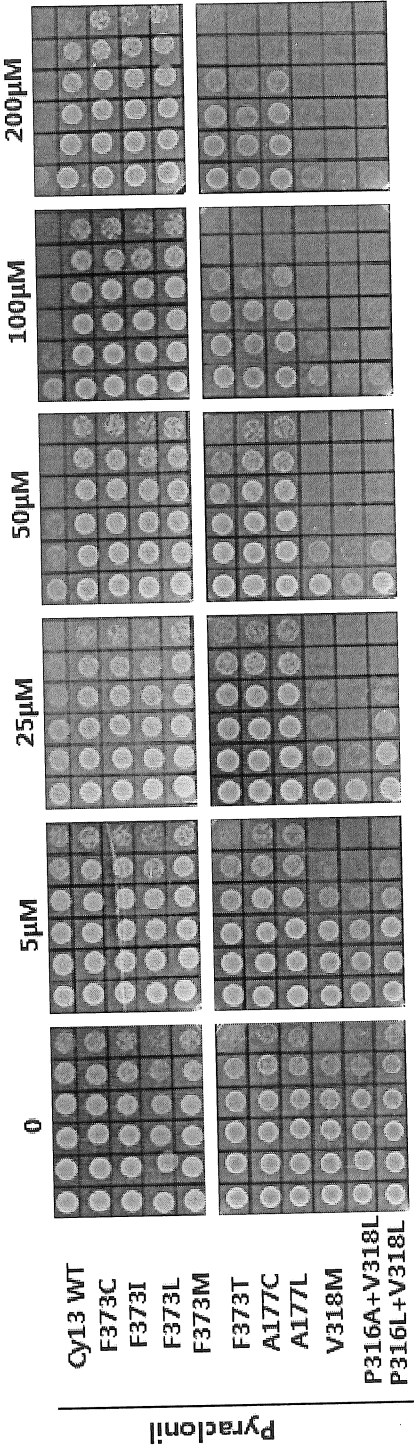
【Fig. 26】



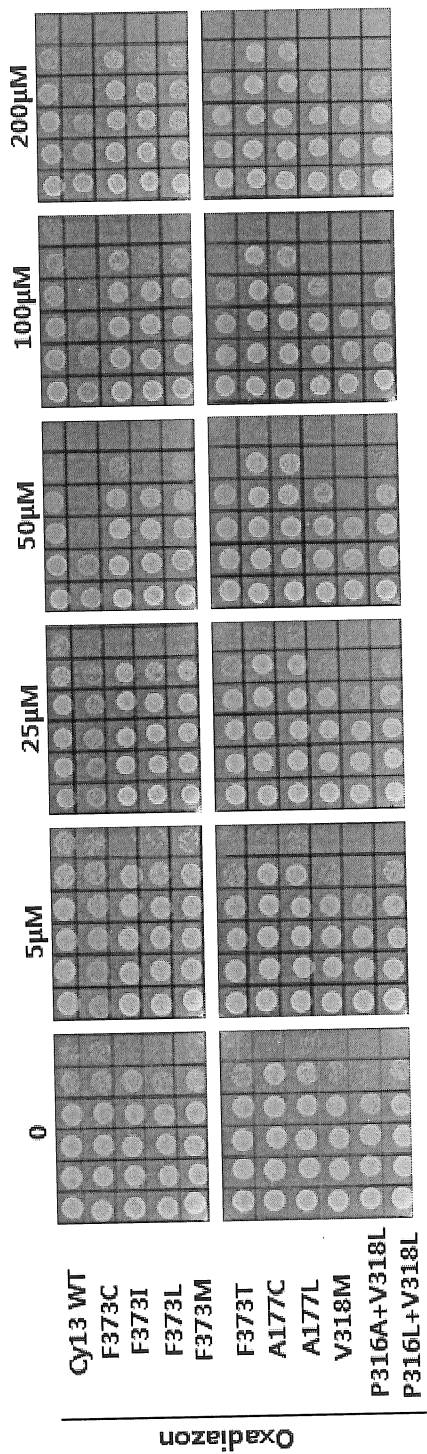
【Fig. 27】



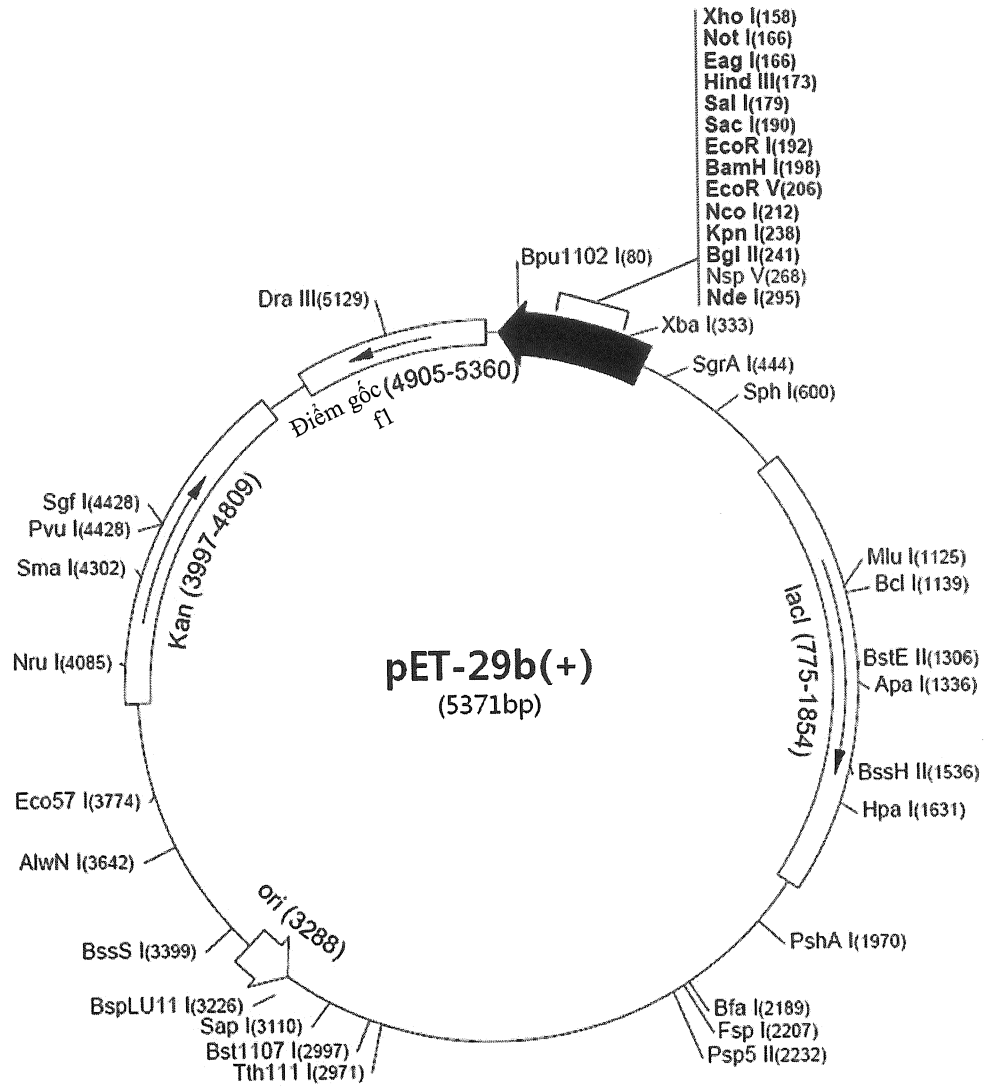
【Fig. 28】



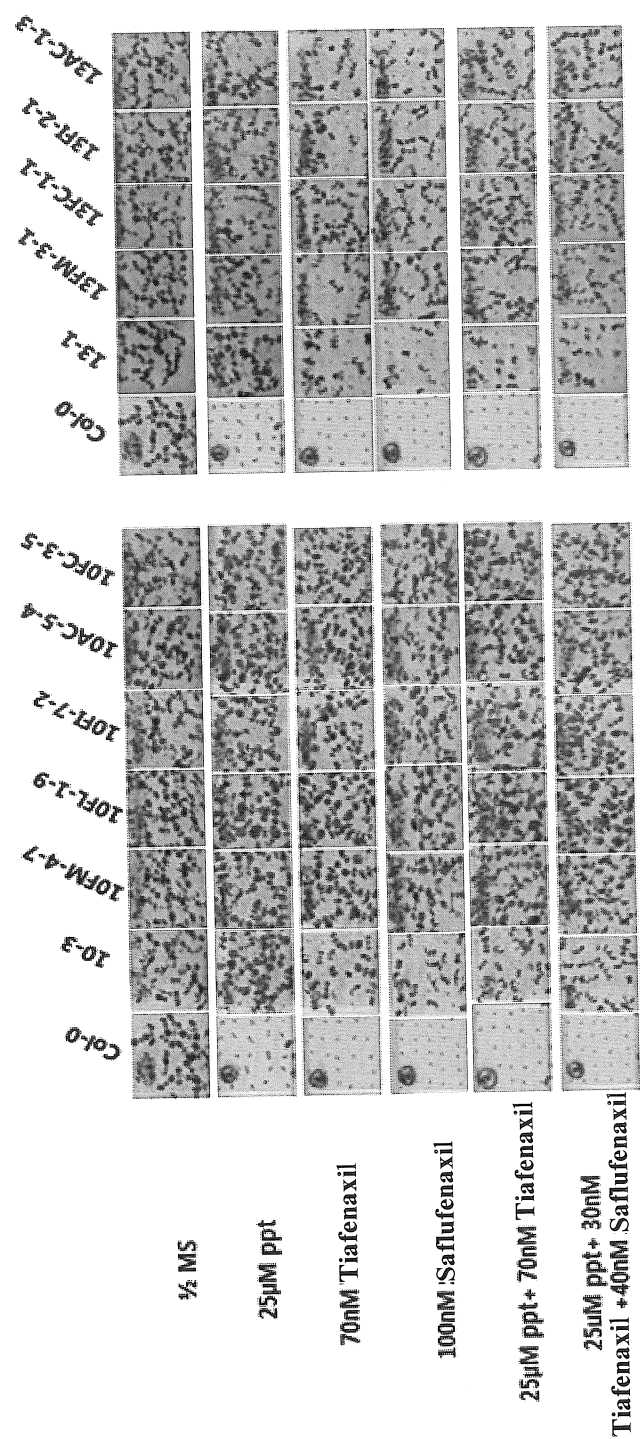
【Fig. 29】



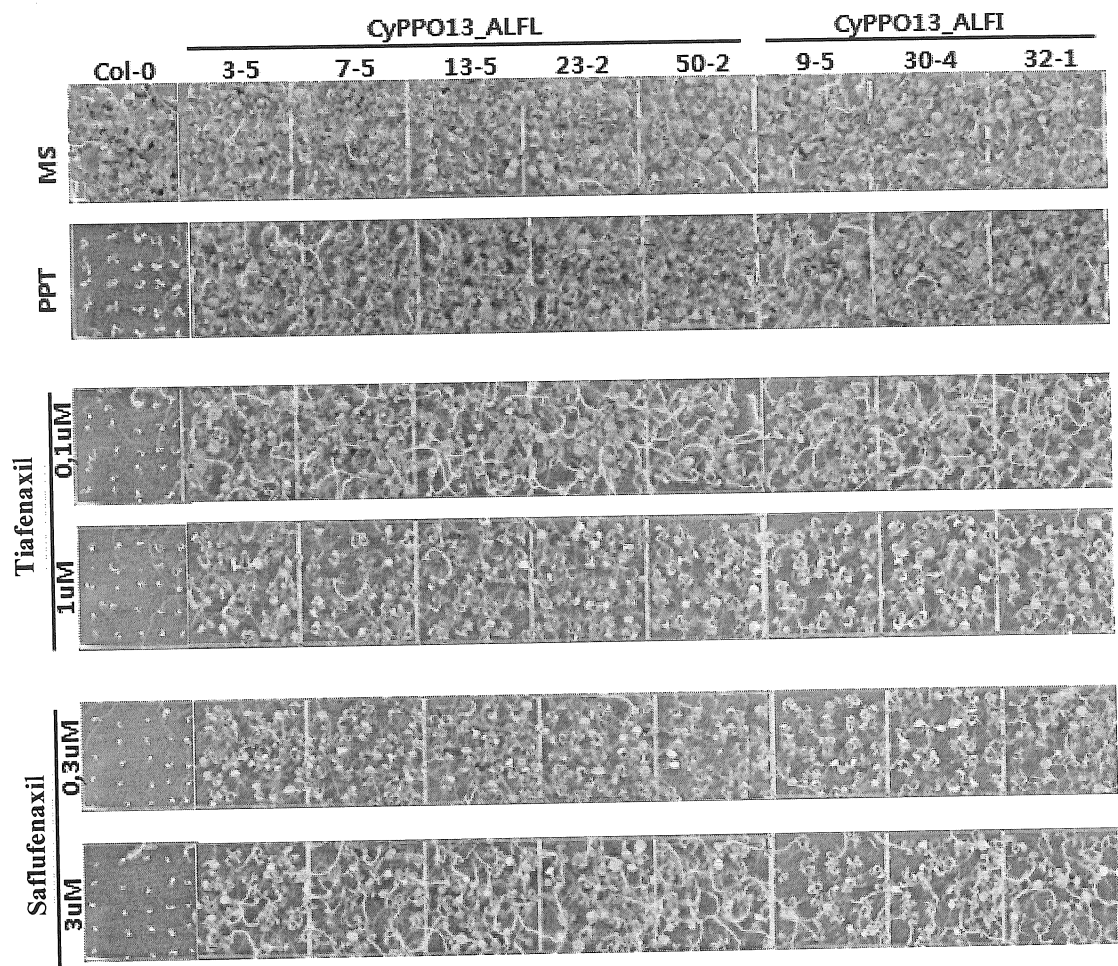
【Fig. 30】



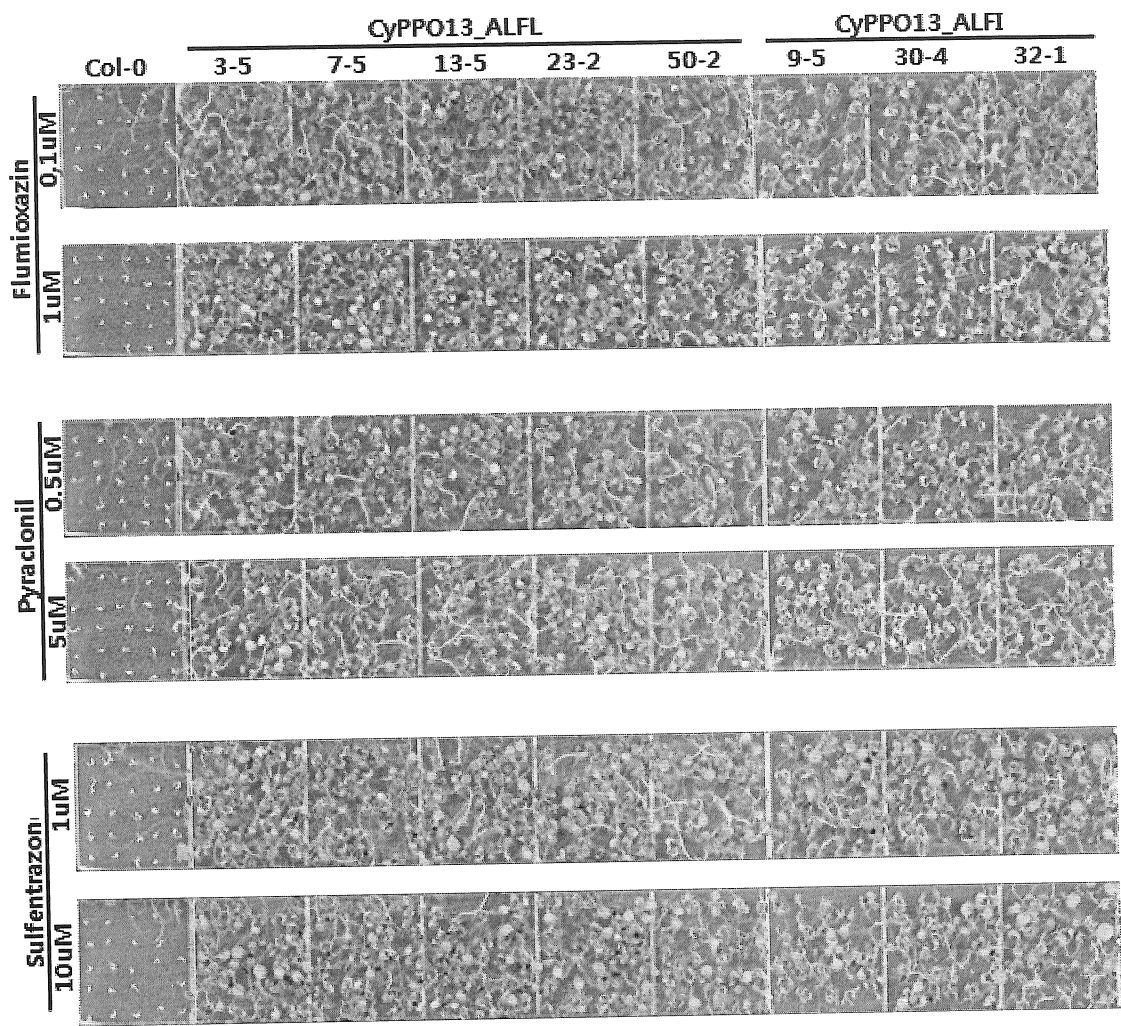
【Fig. 31a】



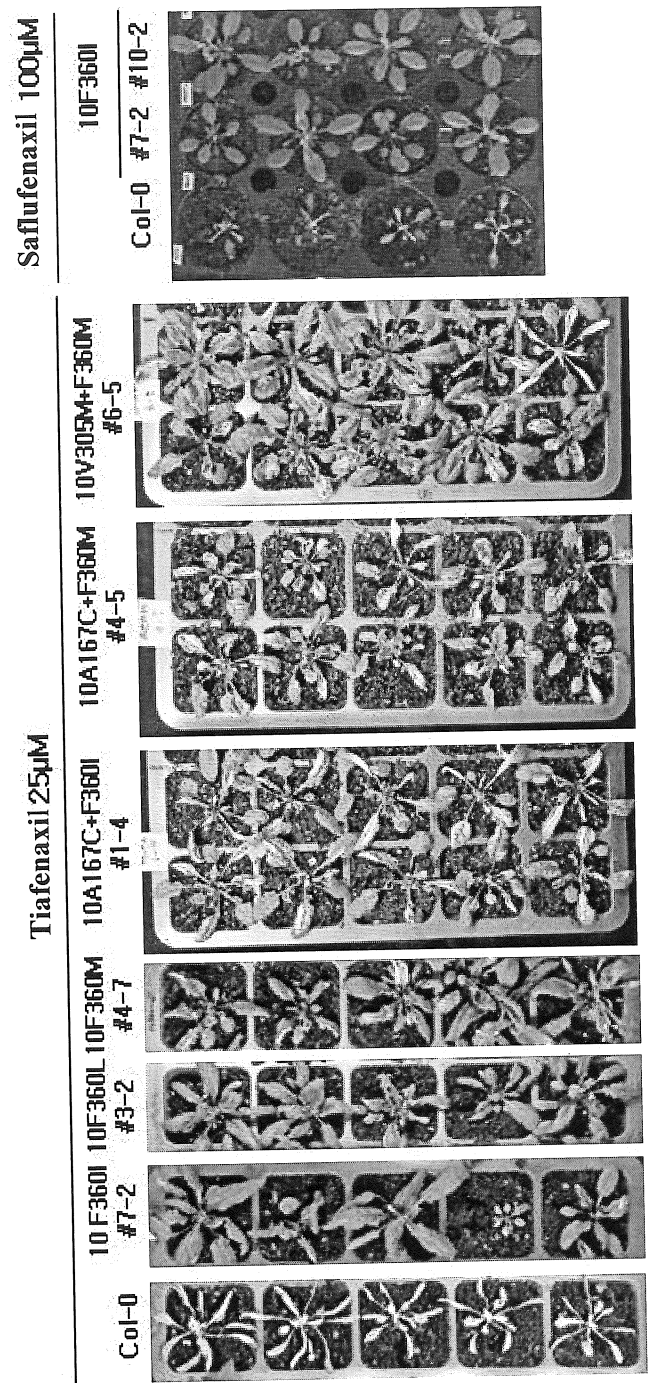
【Fig. 31b】



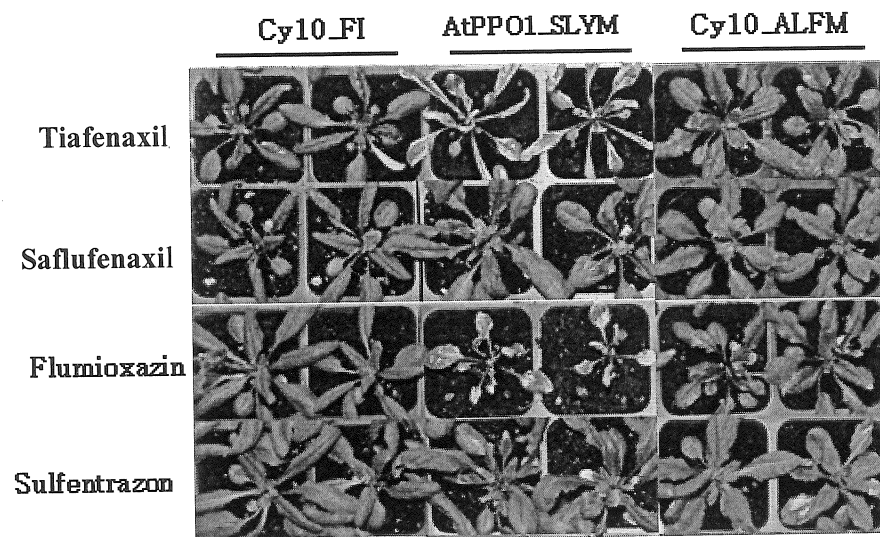
【Fig. 31c】



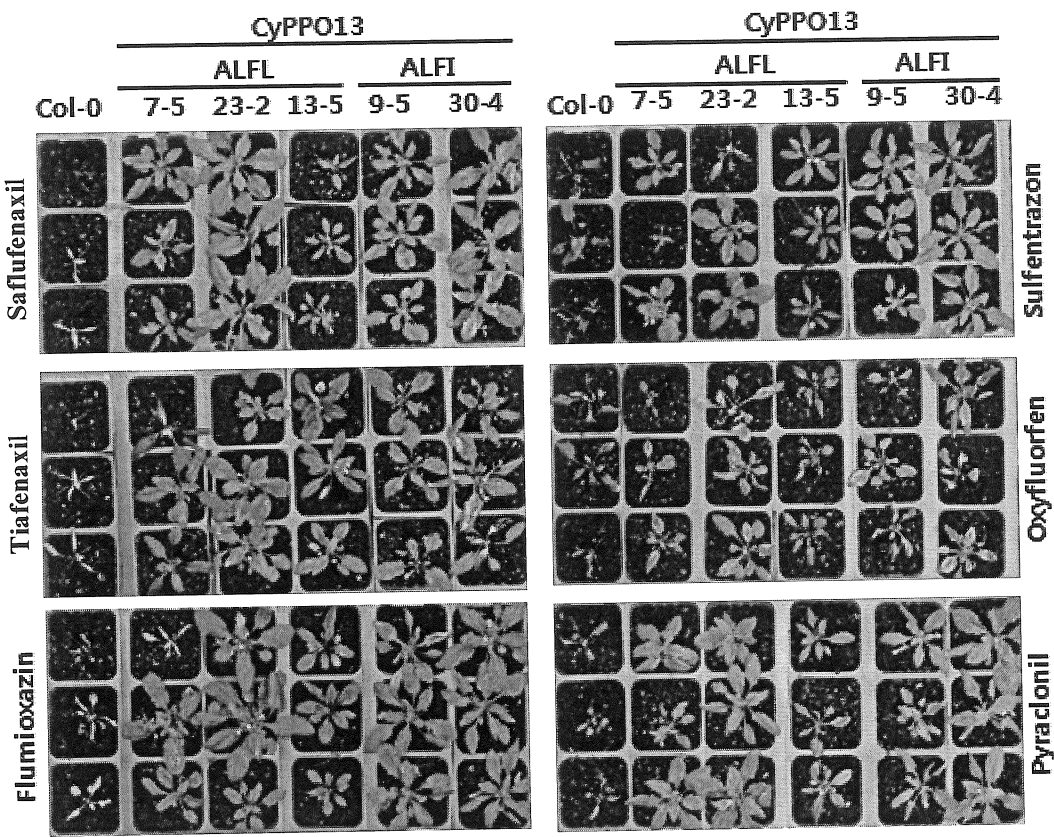
【Fig. 32】



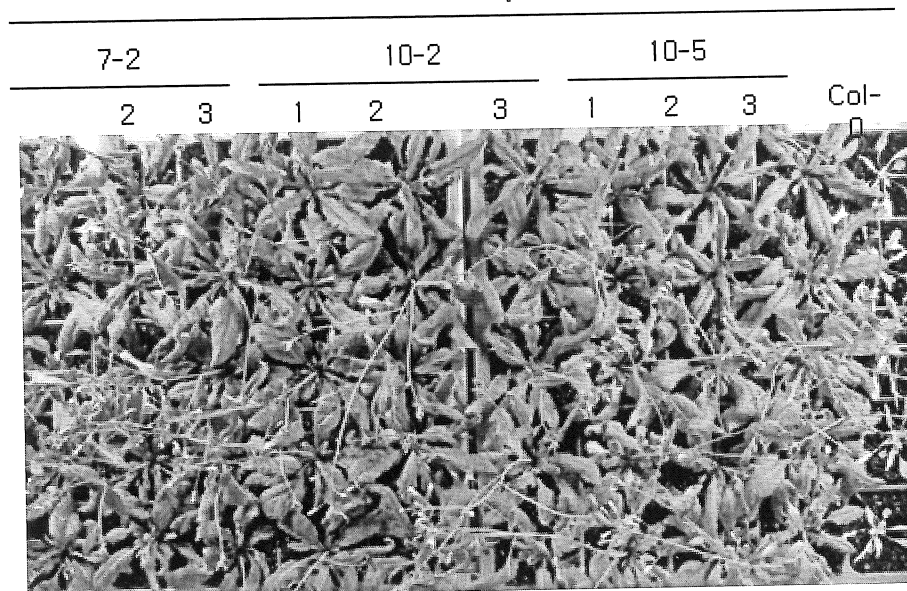
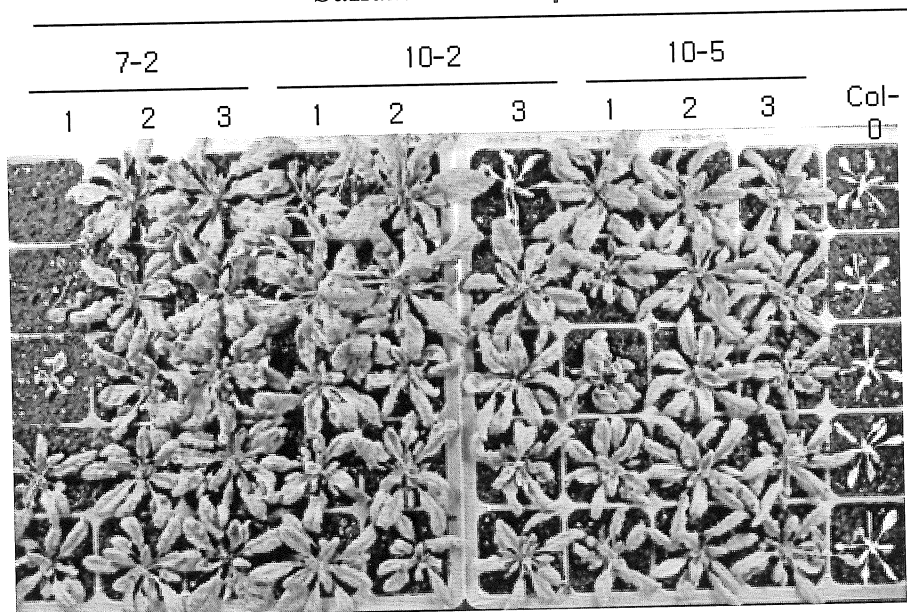
【Fig. 33a】



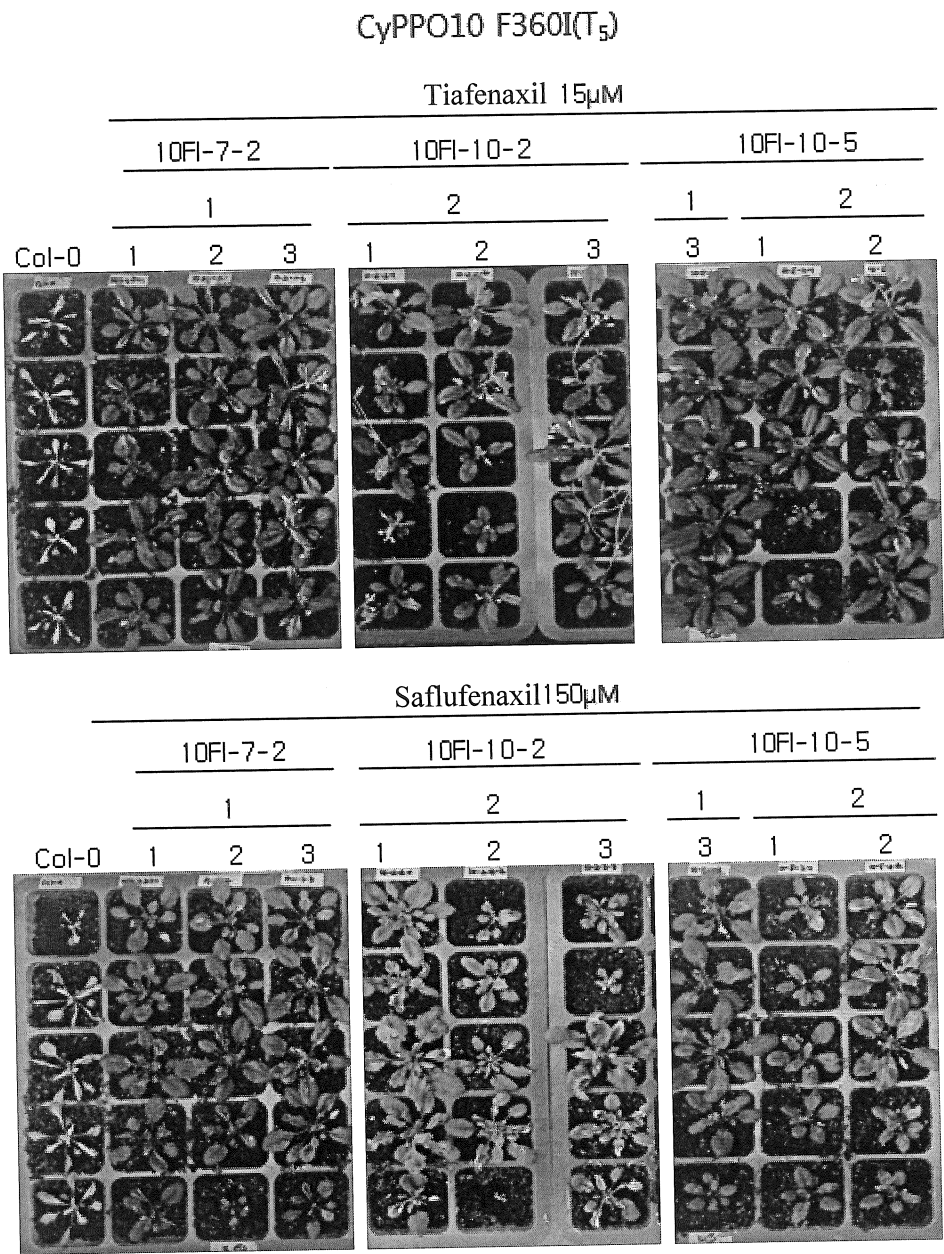
【Fig. 33b】



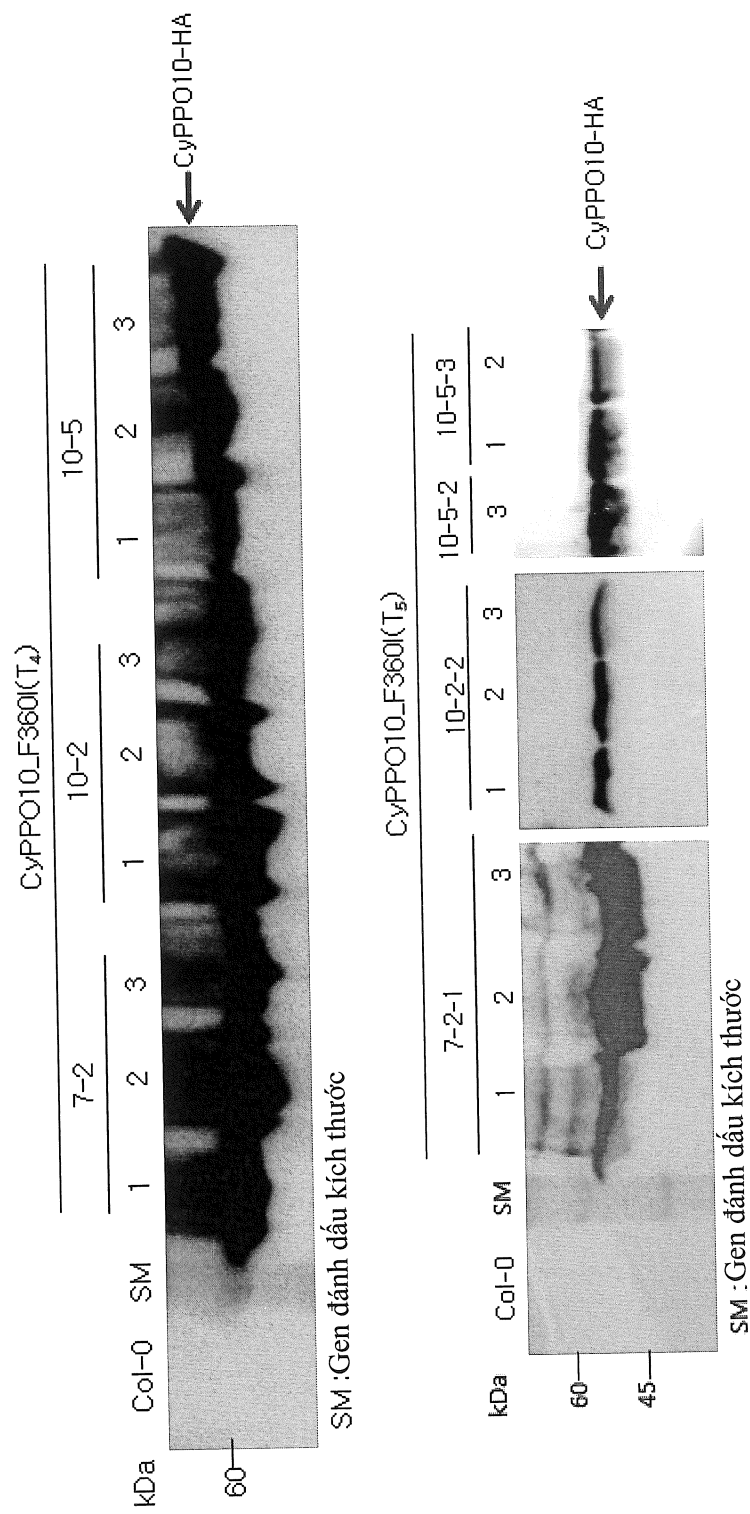
【Fig. 34】

CyPPO10 F360(T₄)Tiafenaxil 15 μ MSaflufenaxil 150 μ M

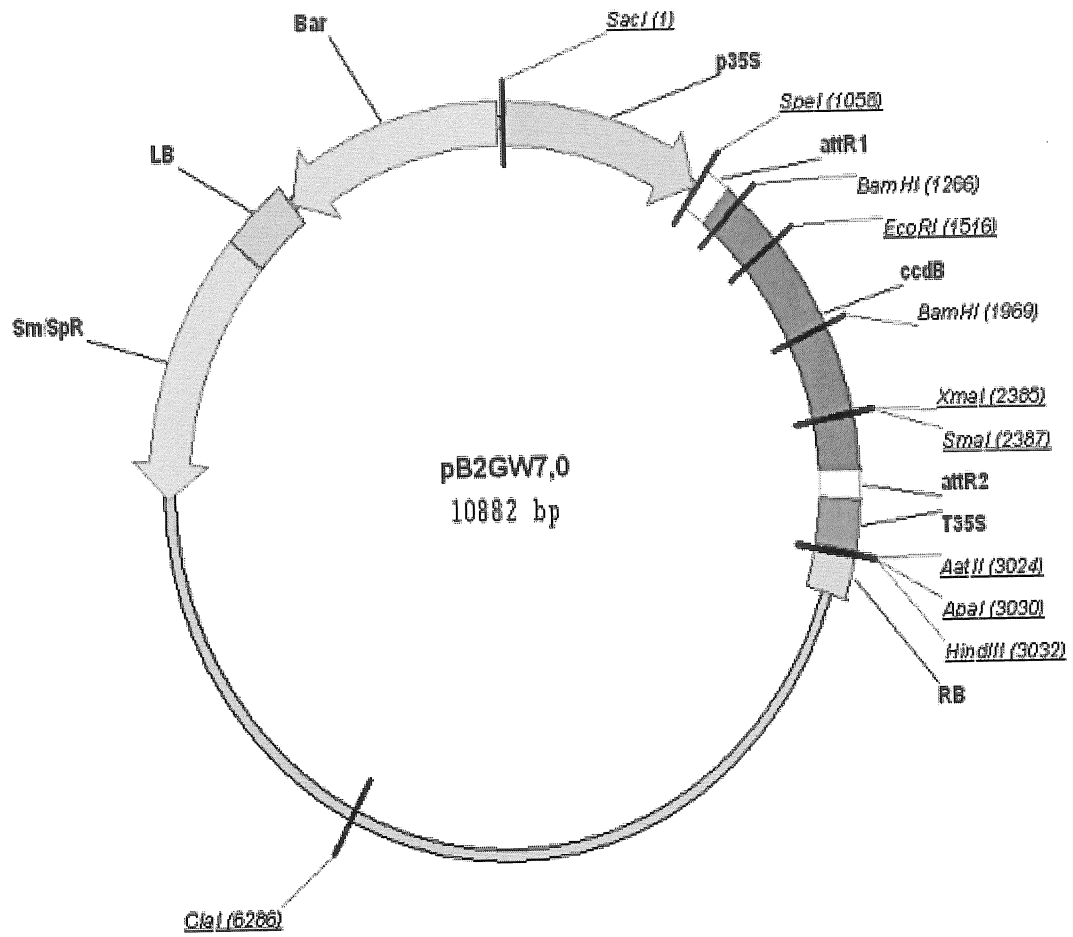
【Fig. 35】



【Fig. 36】

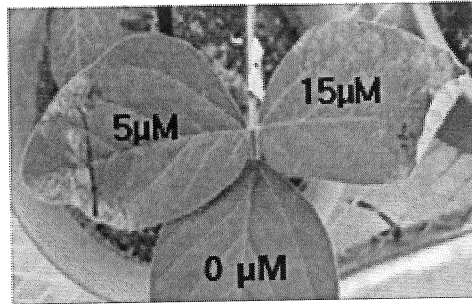


【Fig. 37】

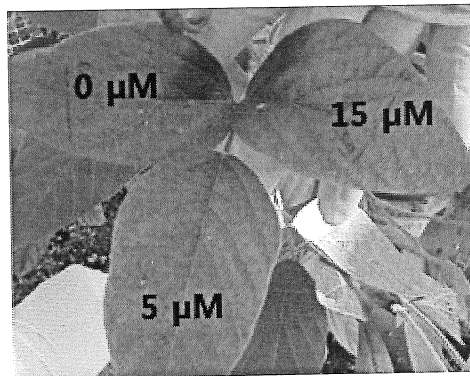


【Fig. 38】

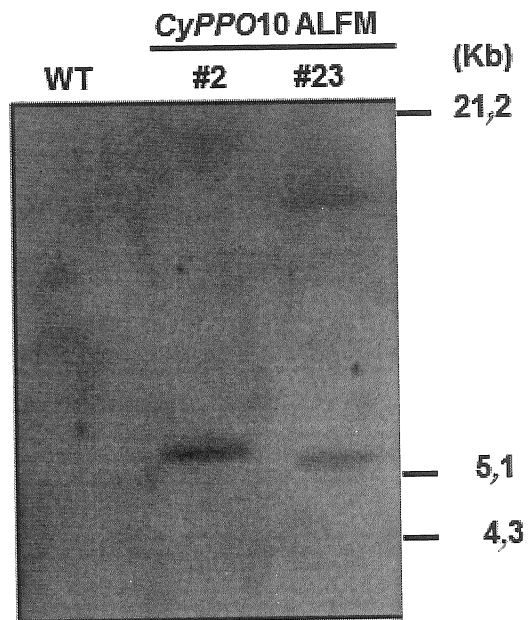
Đậu tương Kwangan
(Kiểu đại)



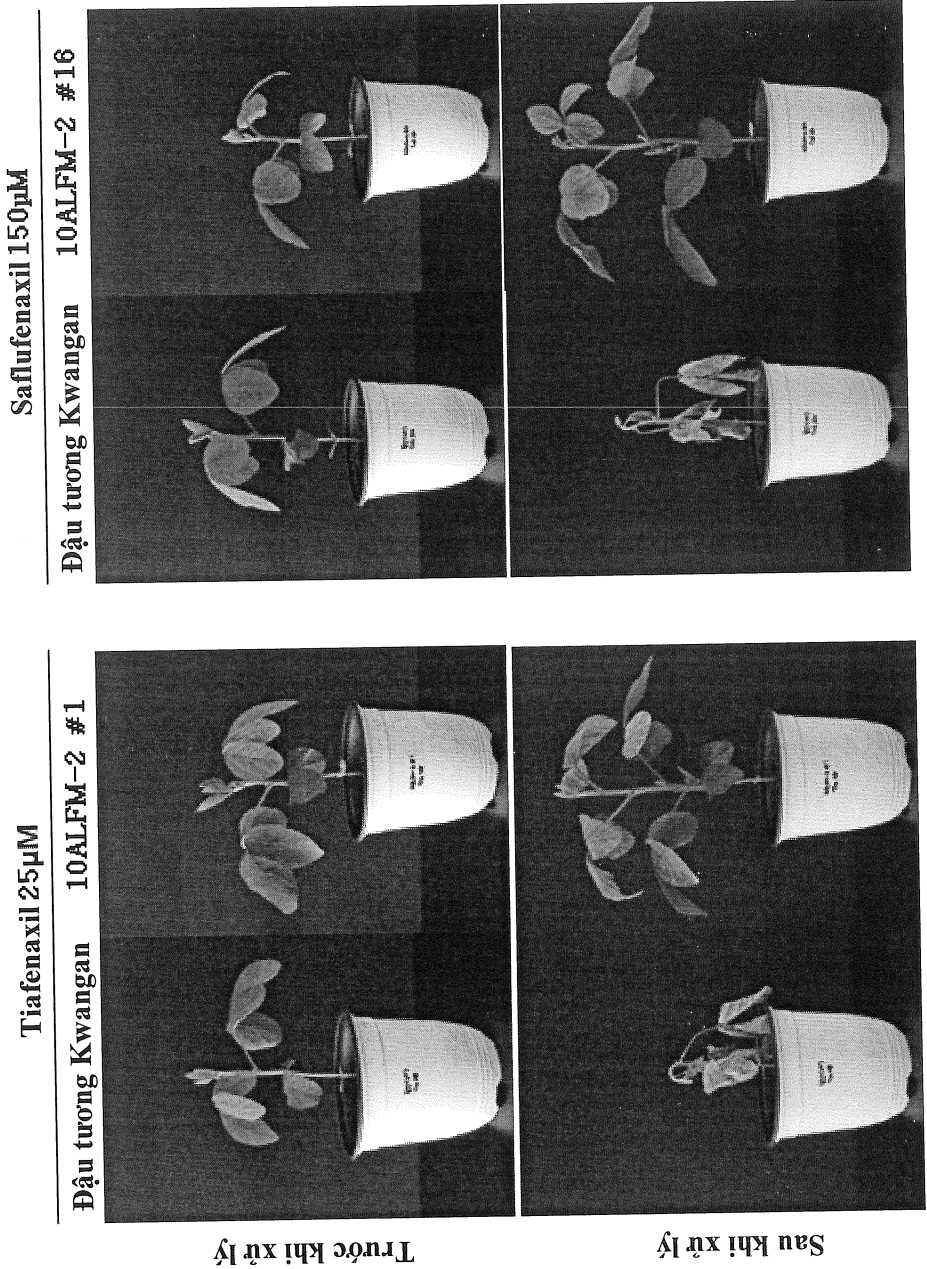
CyPPO10 A167L+F360M #2



【Fig. 39】



【Fig. 40】



【Fig. 41】

