



(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)



1-0036693

(51)⁷ A01N 63/00; C12N 15/82; C07K 14/32 (13) B

(21) 1-2016-02188

(22) 21/11/2014

(86) PCT/US2014/066750 21/11/2014

(87) WO 2015/077525 28/05/2015

(30) 61/908,392 25/11/2013 US

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/10/2016 343A

(73) BASF Agricultural Solutions Seed US LLC (US)

100 Park Avenue, Florham Park, 07932, New Jersey, United States of America

(72) SAMPSON, Kimberly, S. (US); LEHTINEN, Duane (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT QUẦN THỂ LOÀI GÂY HẠI CÁNH NỬA VÀ QUẦN THỂ RẦY GÂY HẠI, PHƯƠNG PHÁP BẢO VỆ CÂY KHỎI LOÀI GÂY HẠI CÁNH NỬA VÀ PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG SẢN LƯỢNG Ở CÂY

(57) Sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp tạo ra hoạt tính diệt loài gây hại cho vi khuẩn, cây, tế bào cây, mô và hạt. Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp diệt hoặc kiểm soát quần thể loài gây hại cánh nửa, đặc biệt là quần thể rầy gây hại. Phương pháp bao gồm việc cho loài gây hại cánh nửa tiếp xúc với lượng có hiệu quả diệt loài gây hại của polypeptit chứa độc tố diệt bộ cánh nửa, đặc biệt là độc tố diệt rầy. Sáng chế còn bao gồm phương pháp làm tăng sản lượng ở cây bằng cách biểu hiện độc tố theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử. Sáng chế đề xuất các gen mới mã hóa protein diệt loài gây hại. Các protein này và trình tự axit nucleic mã hóa chúng là hữu dụng trong việc điều chế chế phẩm diệt loài gây hại và trong việc sản xuất cây chuyển gen kháng loài gây hại.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây trồng chuyển gen được thiết kế để tạo ra độc tố diệt côn trùng chiết xuất từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) được trồng trên hơn 58 triệu hecta trên toàn thế giới vào năm 2010 (James C (2010) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. ISAAA Brief No. 42. Ithaca, New York: ISAAA). Lợi ích của cây trồng Bt bao gồm giảm sử dụng chất diệt côn trùng có hại và đàn áp theo vùng một số loài gây hại nông nghiệp chính (Carrière và cộng sự (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1519–1523; Cattaneo và cộng sự (2006) Proc Natl Acad Sci U S A 103: 7571–7576; Huang và cộng sự (2005) Science 308: 688–690; Wu (2008) Science 321: 1676–1678; và Hutchison và cộng sự (2010) Science 330: 222–225).

Côn trùng hút nhựa cây, bao gồm rệp vừng, ruồi trắng, rệp cây và bọ xít, nổi bật là các loài gây hại nông nghiệp chính. Bộ cánh nửa gây ra thiệt hại trực tiếp bằng cách ăn trên cánh đồng, và trong một số trường hợp thiệt hại gián tiếp bằng cách truyền virus thực vật. Quản lý hiện tại gần như chủ yếu dựa trên việc áp dụng chất diệt côn trùng hóa học theo nhóm. Trong khi việc phát triển cây chuyển gen biểu hiện độc tố dẫn xuất từ Bt đã tạo ra sự bảo vệ cây hiệu quả chống một số loài gây hại côn trùng, độc tố Bt bán trên thị trường thể hiện tính độc thấp đối với côn trùng hút nhựa cây.

Được phát hiện đầu tiên chỉ là các loài gây hại phụ hoặc thứ yếu, các côn trùng này trở thành loài gây hại đầu tiên một phần do thay đổi thực tiễn nông nghiệp, như tăng sử dụng các giống cây chuyển gen và chọn lọc theo nhóm kháng loài gây hại đầu tiên, và giảm áp dụng chất diệt côn trùng hóa học.

Một số loài rệp cây (*Lygus* spp.) là loài gây hại nông nghiệp chính, bao gồm rệp

cây phương tây, *Lygus hesperus* Knight, rệp cây, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois), và rệp xanh hại cây, *Lygus elisus*. *L. hesperus* và *L. lineolaris* là loài gây hại chính của khoảng rộng các cây nông học và làm vườn trên toàn nước Mỹ và Canada (Esquivel and Mowery (2007) Environ. Entomol. 36:725–730; Wheeler A.G., Jr. Biology of the Plant Bugs (Hemiptera: Miridae): Pests, Predators, Opportunists. Comstock Publishing Associates; Ithaca, NY, USA: 2001; Scott D.R. (1977) Bull. Entomol. Soc. Am. 23:19–22; Young O.P. (1986) Ann. Entomol. Soc. Am. 79:747–762). *Lygus* spp. được báo cáo là ăn hại 117 cây không trồng và hơn 25 cây được trồng.

Bộ xít bao gồm tổ hợp các loài gây hại quan trọng nhất, tác động đến 12 cây trồng chính trên toàn thế giới (McPherson J.E., McPherson R.M. Stink Bugs of Economic Importance in America North of Mexico. CRC Press; Boca Raton, FL, USA: 2000). Hơn 50 loài liên quan nhất của bộ xít gây hại cho cây trồng bao gồm cây ăn quả, rau, cây quả hạch, cây lấy sợi, và ngũ cốc. Các loài quan trọng và đông đảo nhất bao gồm bộ xít xanh, *Acrosternum hilare* (Say); bộ xít xanh phương nam, *Nezara viridula* (L.); và bộ xít nâu, *Euschistus servus* (Say). Thiệt hại do bộ xít gây ra ở cây bông của Mỹ ước tính 64 triệu USD năm 2005 và 31 USD triệu năm 2008, trong khi gây thiệt hại ở đậu nành, *Glyxin max* L. Merrill, lên đến 13 triệu USD (Reay-Jones F.P.F. (2010) Environ. Entomol. 39:944–955).

Rệp vừng là tác nhân ăn hại libe duy nhất và là một trong số côn trùng gây thiệt hại kinh tế quan trọng nhất của nền nông nghiệp ôn đới (Blackman R.L. (2000) Aphids on the Worlds Crops, An Identification and Information Guide, John Wiley & Sons; New York, NY). Rệp vừng gây thiệt hại kinh tế chính lên hầu hết tất cả cây trồng, và chiếm đến phần lớn trong 13% sản lượng nông nghiệp ước tính bị mất do các côn trùng gây hại (van Emden H., Harrington R. Aphids as Crop Pests. CABI Publishing; London, UK: 2007. p. 717; Faria C.A., Wackers F.L., Pritchard J., Barrett D.A., Turlings T.C. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteran pests. PLoS One. 2007;2:e600).

Hai loài gây hại chính của cây lúa, rầy nâu hại lúa (BPH), *Nilaparvata lugens*, và rầy xanh hại lá lúa, *Nephotettix* spp., gây ra thiệt hại sinh lý nghiêm trọng cho cây lúa, và đóng vai trò là vectơ của virus gây bệnh tungro ở lúa quan trọng về kinh tế, virus gây bệnh lùn xoắn lá và virus gây bệnh lùn xoắn lá lúa (Mochida và cộng sự (1979) Some Considerations on Screening Resistant Cultivars/Lines of Rice Plant to the Brown

Planthopper, Nilparvata Lugens (Stal) (Hom., Delphacidae). Los Banos, Philippines: IRRI, pp. 1-9; Saxena, R.C. & Khan, Z.R. (1989) Agri. Zool. Rev., 3, 97-132). Một trong các hạn chế chính đối với việc làm tăng sản lượng lúa ở Đông Nam Á là rầy nâu hại lúa (BPH) mà gây ra “cháy rầy” và đóng vai trò làm vector cho các bệnh do virus. Một vài nhân tố, bao gồm khả năng phát triển sức kháng của rầy nâu đối với chất diệt côn trùng thông thường, và sự mất cân bằng sinh thái trong mối quan hệ động vật ăn hại-cây bị hại ở ruộng lúa do sự lạm dụng chất diệt côn trùng, gây ra sự hồi sinh của BPH.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các chế phẩm và phương pháp để tạo ra hoạt tính diệt loài gây hại cho vi khuẩn, cây, tế bào cây, mô và hạt được đề xuất. Cụ thể là, phương pháp diệt hoặc kiểm soát quần thể loài gây hại cánh nửa, đặc biệt là quần thể rầy gây hại, được đề xuất. Phương pháp bao gồm việc cho loài gây hại cánh nửa tiếp xúc với lượng có hiệu quả diệt loài gây hại của polypeptit chứa độc tố diệt bộ cánh nửa, đặc biệt là độc tố diệt rầy. Theo nhiều phương án khác nhau, độc tố diệt bộ cánh nửa chứa tính tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4, hoặc các biến thể hoặc các đoạn của chúng có hiệu quả diệt loài gây hại. Theo một số phương án, phương pháp bảo vệ cây hoặc tế bào của nó khỏi quần thể loài gây hại cánh nửa, đặc biệt là rầy gây hại, bao gồm việc biểu hiện ở cây hoặc tế bào của nó axit nucleic mã hóa SEQ ID NO:3 hoặc 4, hoặc biến thể hoặc đoạn của chúng, trong đó axit nucleic liên kết hoạt động với gen khởi động có khả năng định hướng biểu hiện của axit nucleic ở tế bào cây.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp làm tăng sản lượng ở cây bao gồm việc trồng trên cánh đồng cây hoặc hạt của nó đã kết hợp ổn định vào bộ gen của nó cấu trúc ADN chứa axit nucleic liên kết hoạt động với gen khởi động có khả năng định hướng biểu hiện của axit nucleic ở tế bào cây, trong đó axit nucleic mã hóa SEQ ID NO:3 hoặc 4, hoặc biến thể hoặc đoạn của chúng có hiệu quả diệt loài gây hại.

Các chế phẩm và phương pháp theo sáng chế là hữu dụng để tạo ra các cơ quan có sức kháng hoặc khả năng chịu loài gây hại. Các cơ quan và chế phẩm này bao gồm các cơ quan được mong muốn cho các mục đích nông nghiệp.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp để điều chỉnh sức kháng hoặc khả năng chịu loài gây hại ở các cơ quan, đặc biệt là cây hoặc tế bào cây. Thuật ngữ “sức kháng” để chỉ loài gây hại (ví dụ, côn trùng) bị giết khi ăn vào hoặc tiếp xúc khác với polypeptit theo sáng chế. Thuật ngữ “khả năng chịu” để chỉ sự làm suy yếu hoặc giảm sự di chuyển, ăn hại, sinh sôi, hoặc chức năng khác của loài gây hại. Phương pháp liên quan đến việc biến đổi các cơ quan với trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại theo sáng chế. Cụ thể là, trình tự nucleotit theo sáng chế là hữu dụng để tạo ra cây và vi sinh vật có hoạt tính diệt loài gây hại. Các phương pháp được mô tả ở đây là hữu dụng để kiểm soát hoặc diệt quần thể loài gây hại cánh nửa và để tạo ra chế phẩm có hoạt tính diệt loài gây hại chống loài gây hại cánh nửa.

Thuật ngữ “độc tố diệt loài gây hại” hoặc “protein diệt loài gây hại” để chỉ độc tố mà có hoạt tính độc kháng một hoặc nhiều loài gây hại cánh nửa, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *Lygus* spp., như rệp cây phương tây (*Lygus hesperus*), rệp cây (*Lygus lineolaris*), và rệp xanh hại cây (*Lygus elisus*); rệp vùng, như rầy xanh hại đào (*Myzus persicae*), rầy mềm hại bông (*Aphis gossypii*), rầy hại anh đào hoặc rầy đen hại anh đào (*Myzus cerasi*), rầy hại đậu nành (*Aphis glyxins* Matsumura); rầy nâu (*Nilaparvata lugens*), rầy xanh hại lá lúa (*Nephotettix* spp.), rầy lưng trắng (*Sogatella furcifera*) và rầy nâu nhỏ (*Laodelphax striatellus*); và bọ xít, như bọ xít xanh (*Acrosternum hilare*), bọ xít nâu (*Halyomorpha halys*), bọ xít xanh phương nam (*Nezara viridula*), bọ xít hại lúa (*Oebalus pugnax*), bọ xít rừng (*Pentatoma rufipes*), bọ xít châu âu (*Rhaphigaster nebulosa*), và bọ cánh hình khiên *Troilus luridus*. Protein diệt loài gây hại chứa trình tự axit amin suy từ trình tự nucleotit có chiều dài đầy đủ được bộc lộ ở đây, và trình tự axit amin mà ngắn hơn trình tự có chiều dài đầy đủ, hoặc là do sử dụng điểm bắt đầu xuôi dòng thay thế, hoặc do quá trình tạo ra protein ngắn hơn có hoạt tính diệt loài gây hại. Quá trình có thể xảy ra ở cơ quan mà protein được biểu hiện trong đó, hoặc ở loài gây hại sau khi ăn phải protein.

Theo các phương án cụ thể, protein diệt loài gây hại chứa protein Axmi011 nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4, cũng như các biến thể và các đoạn của chúng.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp diệt hoặc kiểm soát quần thể loài gây hại cánh nửa bao gồm việc cho loài gây hại tiếp xúc, hoặc phơi loài gây hại ra, chế phẩm chứa độc tố diệt loài gây hại theo sáng chế.

Phân tử axit nucleic phân lập, và các biến thể và các đoạn của chúng

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phân tử axit nucleic phân lập hoặc tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại và polypeptit hoặc phân hoạt tính sinh học của chúng, cũng như phân tử axit nucleic đủ để dùng làm mẫu dò lai để xác định phân tử axit nucleic mã hóa protein với các vùng tương đồng trình tự. Cũng bao gồm trong bản mô tả này là trình tự nucleotit có khả năng lai với trình tự nucleotit theo sáng chế dưới các điều kiện nghiêm ngặt như được xác định ở đâu đó trong bản mô tả này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử axit nucleic” bao gồm phân tử ADN (ví dụ, ADN tái tổ hợp, cADN hoặc ADN bộ gen) và phân tử ARN (ví dụ, mARN) và chất tương tự của ADN hoặc ARN được tạo ra bằng cách sử dụng các chất tương tự nucleotit. Phân tử axit nucleic có thể là một sợi hoặc hai sợi, nhưng tốt hơn là ADN hai sợi.

Trình tự axit nucleic (hoặc ADN) “phân lập” hoặc “tái tổ hợp” được sử dụng ở đây để đề cập đến trình tự axit nucleic (hoặc ADN) mà không còn ở trong môi trường tự nhiên của nó, ví dụ ở *trong ống nghiệm* hoặc ở tế bào vi khuẩn tái tổ hợp hoặc tế bào chủ của cây. Theo một số phương án, axit nucleic phân lập hoặc tái tổ hợp không có các trình tự (tốt hơn là trình tự mã hóa protein) mà tạo cánh tự nhiên axit nucleic (cụ thể là, các trình tự nằm ở các đầu 5' và 3' của axit nucleic) trong ADN bộ gen của cơ quan mà từ đó axit nucleic được dẫn xuất ra. Theo các mục đích của sáng chế, “phân lập” khi được sử dụng để đề cập đến phân tử axit nucleic không bao gồm nhiễm sắc thể phân lập. Ví dụ, theo nhiều phương án khác nhau, phân tử axit nucleic mã hóa nội độc tố delta phân lập có thể chứa ít hơn khoảng 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb, hoặc 0,1 kb trình tự nucleotit mà tạo cánh tự nhiên phân tử axit nucleic trong ADN bộ gen của tế bào mà từ đó axit nucleic được dẫn xuất ra. Theo nhiều phương án khác nhau, protein nội độc tố delta mà cơ bản không có vật liệu tế bào bao gồm chế phẩm protein có ít hơn khoảng 30%, 20%, 10%, hoặc 5% (theo khối lượng khô) protein không nội độc tố delta (còn gọi là “protein lẫn tạp chất”).

Trình tự nucleotit mã hóa protein theo sáng chế chứa trình tự nêu ở SEQ ID NO:1-2, và các biến thể, các đoạn, và các phần bổ sung của chúng. Thuật ngữ “phần bổ sung” để chỉ trình tự nucleotit mà bổ sung đủ cho trình tự nucleotit đưa ra sao cho nó có thể lai với trình tự nucleotit đưa ra để từ đó tạo thành sợi kép ổn định. Trình tự axit amin tương

ứng cho protein diệt loài gây hại được mã hóa bởi các trình tự nucleotit này được nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4.

Phân tử axit nucleic mà là các đoạn của các trình tự nucleotit này mã hóa protein diệt loài gây hại cũng được bao hàm trong sáng chế. Thuật ngữ “đoạn” để chỉ phần của trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại. Đoạn trình tự nucleotit có thể mã hóa phần hoạt tính sinh học của protein diệt loài gây hại, hoặc có thể là đoạn mà có thể được dùng làm mẫu dò lai hoặc đoạn mồi PCR sử dụng các phương pháp được bộc lộ dưới đây. Phân tử axit nucleic mà là các đoạn trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại bao gồm ít nhất khoảng 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 nucleotit liên kề, hoặc đến số lượng nucleotit có mặt ở trình tự nucleotit chiều dài đầy đủ mã hóa protein diệt loài gây hại được bộc lộ ở đây, phụ thuộc vào mục đích sử dụng. Thuật ngữ nucleotit “liên kề” để chỉ các gốc nucleotit mà liên ngay với gốc khác. Các đoạn trình tự nucleotit theo sáng chế sẽ mã hóa các đoạn protein mà giữ hoạt tính sinh học của protein diệt loài gây hại và, vì vậy, giữ hoạt tính diệt loài gây hại. Do đó, các đoạn hoạt tính sinh học của polypeptit được bộc lộ ở đây cũng được bao gồm. Thuật ngữ “giữ hoạt tính” nghĩa là đoạn này sẽ có ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 70%, 80%, 90%, 95% hoặc cao hơn hoạt tính diệt loài gây hại của protein diệt loài gây hại. Theo một phương án, hoạt tính diệt loài gây hại là hoạt tính diệt bọ cánh cứng. Theo một phương án khác, hoạt tính diệt loài gây hại là hoạt tính diệt bọ cánh vảy. Theo một phương án khác, hoạt tính diệt loài gây hại là hoạt tính diệt giun tròn. Theo một phương án khác, hoạt tính diệt loài gây hại là hoạt tính diệt bọ hai cánh. Theo một phương án khác, hoạt tính diệt loài gây hại là hoạt tính diệt bọ cánh nửa. Phương pháp để đo hoạt tính diệt loài gây hại là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews và cộng sự (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone và cộng sự (1985) *J. of Economic Entomology* 73:290-293; và Sáng chế Mỹ số 5,743,477; và Heong và cộng sự (2013) *Research methods in toxicology and insecticide resistance monitoring of rice planthoppers, tái bản lần thứ 2*, Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Đoạn trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại mà mã hóa phần hoạt tính sinh học của protein theo sáng chế sẽ mã hóa ít nhất khoảng 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 axit amin liên kề, hoặc đến tổng số axit amin có mặt ở protein

diệt loài gây hại chiều dài đầy đủ theo sáng chế. Theo một số phương án, đoạn này là đoạn phân cắt protein phân giải. Ví dụ, đoạn phân cắt protein phân giải có thể có phân cắt cắt đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C có ít nhất khoảng 30 axit amin, ít nhất khoảng 40 axit amin, ít nhất khoảng 50, ít nhất khoảng 100 axit amin, khoảng 120, khoảng 130, khoảng 140, khoảng 150, hoặc khoảng 160 axit amin so với SEQ ID NO:3 hoặc 4. Theo một số phương án, các đoạn được bao gồm ở đây thu được từ việc loại bỏ vùng tinh thể hóa đầu tận cùng C, ví dụ, bằng cách phân giải protein, hoặc bằng cách chèn mã kết thúc vào trình tự mã hóa. Theo một số phương án, các đoạn bao gồm ở đây thu được từ việc loại bỏ peptit tín hiệu đầu tận cùng N (ví dụ, SEQ ID NO:4). Phần cắt đầu tận cùng N có thể còn chứa gốc methionin ở các đầu N.

Protein diệt loài gây hại được ưu tiên theo sáng chế được mã hóa bởi trình tự nucleotit đủ tương đồng với trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:1-2, hoặc protein diệt loài gây hại đủ tương đồng với trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4. Thuật ngữ “đủ tương đồng” để chỉ trình tự axit amin hoặc nucleotit mà có ít nhất khoảng 60% hoặc 65% tương đồng trình tự, khoảng 70% hoặc 75% tương đồng trình tự, khoảng 80% hoặc 85% tương đồng trình tự, khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc tương đồng trình tự cao hơn so với trình tự tham khảo bằng cách sử dụng một trong các chương trình sắp thẳng hàng trình tự được mô tả ở đây sử dụng các thông số tiêu chuẩn. Chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng các giá trị này có thể được điều chỉnh phù hợp để xác định sự tương đồng tương ứng của protein được mã hóa bởi hai trình tự nucleotit bằng cách xem xét suy biến mã, tương tự axit amin, định vị khung đọc, và tương tự.

Để xác định phần trăm tương đồng của hai trình tự axit amin hoặc của hai axit nucleic, các trình tự được sắp thẳng hàng để so sánh tối ưu. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là hàm của số lượng các vị trí tương đồng có chung giữa các trình tự (cụ thể là, phần trăm tương đồng = số các vị trí tương đồng/tổng số vị trí (ví dụ, các vị trí trùng lặp) x 100). Theo một phương án, hai trình tự có chiều dài giống nhau. Theo một phương án khác, phần trăm tương đồng được tính toán qua toàn bộ trình tự tham khảo (cụ thể là, trình tự được bộc lộ ở đây là bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-3). Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật tương tự với các kỹ thuật được mô tả dưới đây, có hoặc không cho phép các chỗ trống. Khi tính toán phần trăm tương đồng, các điểm bắt cặp cơ bản chính xác được tính. Chỗ trống, cụ thể là vị trí

trong sắp hàng khi gốc có mặt ở một trình tự nhưng không có mặt ở trình tự kia, được coi là vị trí có các gốc không tương đồng.

Việc xác định phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thuật toán. Ví dụ không giới hạn của thuật toán toán học được dùng để so sánh hai trình tự là thuật toán của Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, được cải biến thành Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Thuật toán này được kết hợp vào chương trình BLASTN and BLASTX của Altschul và cộng sự (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Nghiên cứu nucleotit BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTN, điểm = 100, chiều dài từ = 12, để thu được trình tự nucleotit tương đồng với phân tử axit nucleic kiểu diệt loài gây hại theo sáng chế. Nghiên cứu protein BLAST có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTX, điểm = 50, chiều dài từ = 3, để thu được trình tự axit amin tương đồng với phân tử protein diệt loài gây hại theo sáng chế. Để thu được sắp hàng bị trống để so sánh, Gapped BLAST (trong BLAST 2.0) có thể được sử dụng như mô tả trong Altschul và cộng sự (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Tùy ý, PSI-Blast có thể được sử dụng để thực hiện nghiên cứu lặp mà xác định mối liên hệ khoảng cách giữa các phân tử. Tham khảo Altschul và cộng sự (1997) ở trên. Khi sử dụng các chương trình BLAST, Gapped BLAST, và PSI-Blast, các thông số mặc định của các chương trình tương ứng (ví dụ, BLASTX và BLASTN) có thể được sử dụng. Sự sắp hàng cũng có thể được thực hiện thủ công bằng cách kiểm tra.

Ví dụ không giới hạn khác của thuật toán toán học được sử dụng để so sánh các trình tự là thuật toán ClustalW (Higgins và cộng sự (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW so sánh các trình tự và sắp hàng toàn bộ trình tự axit amin hoặc ADN, và do đó có thể tạo ra dữ liệu bảo đảm khoảng trình tự của toàn bộ trình tự axit amin. Thuật toán ClustalW được sử dụng trong một số gói phần mềm phân tích ADN/axit amin bán trên thị trường, như mô đun ALIGNX của Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Sau khi sắp hàng các trình tự axit amin bằng ClustalW, phần trăm tương đồng có thể được đánh giá. Ví dụ không giới hạn của chương trình phần mềm hữu dụng để phân tích sắp hàng ClustalW là GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) cho phép đánh giá sự tương tự và tương đồng axit amin (hoặc ADN) giữa nhiều protein. Ví dụ không giới hạn khác của thuật toán toán học được sử dụng để so sánh các trình tự là thuật toán của Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Thuật toán

này được kết hợp vào chương trình ALIGN (phiên bản 2.0), là một phần của Gói phần mềm GCG Wisconsin Genetics Software Package, Phiên bản 10 (được mua từ Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, Mỹ). Khi sử dụng chương trình ALIGN để so sánh trình tự axit amin, bảng gốc khối lượng PAM120, điểm phạt chiều dài chỗ trống bằng 12, và điểm phạt chỗ trống bằng 4 có thể được sử dụng.

Trừ khi có quy định khác, GAP Phiên bản 10, mà sử dụng thuật toán của Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, sẽ được sử dụng để xác định sự tương đồng hoặc tương tự bằng trình tự cách sử dụng các thông số sau: % tương đồng và % tương tự đối với trình tự nucleotit sử dụng Khối lượng GAP bằng 50 và Khối lượng Chiều dài bằng 3, và ma trận tính điểm nwsgapadn.cmp; % tương đồng và % tương tự đối với trình tự axit amin sử dụng khối lượng GAP bằng 8 và khối lượng chiều dài bằng 2, và chương trình tính điểm BLOSUM62. Các chương trình tương đương cũng có thể được sử dụng. Thuật ngữ “chương trình tương đương” để chỉ bất kỳ chương trình so sánh trình tự mà, đối với bất kỳ hai trình tự cần so sánh, tạo ra sự sắp hàng có các bắt cặp gốc nucleotit tương đồng và phần trăm tương đồng của tương đồng trình tự khi so với sắp hàng tương ứng được tạo ra bởi GAP Phiên bản 10.

Sáng chế còn bao gồm phân tử axit nucleic biến thể. “Các biến thể” của trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại bao gồm các trình tự mà mã hóa protein diệt loài gây hại được bộc lộ ở đây nhưng hơi khác do sự suy biến của mã gen cũng như trình tự đủ tương đồng như thảo luận ở trên. Các biến thể alen xảy ra trong tự nhiên có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử đã biết, như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và kỹ thuật lai như mô tả dưới đây. Trình tự nucleotit biến thể còn bao gồm trình tự nucleotit dẫn xuất nhân tạo mà được tạo ra, ví dụ, bằng cách đột biến điểm định vị nhưng vẫn mã hóa protein diệt loài gây hại được bộc lộ trong sáng chế này được đề cập dưới đây. Protein biến thể theo sáng chế có hoạt tính sinh học, tức là chúng tiếp tục sở hữu hoạt tính sinh học mong muốn của protein tự nhiên, tức là, hoạt tính diệt loài gây hại. Thuật ngữ “giữ hoạt tính” nghĩa là biến thể sẽ có ít nhất khoảng 30%, ít nhất khoảng 50%, ít nhất khoảng 70%, hoặc ít nhất khoảng 80% hoạt tính diệt loài gây hại của protein tự nhiên. Phương pháp để đo hoạt tính diệt loài gây hại là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews và cộng sự (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone và cộng sự (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và Sáng chế Mỹ số 5,743,477; và Heong và

cộng sự (2013) *Research methods in toxicology and insecticide resistance monitoring of rice planthoppers, tái bản lần thứ 2*, Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng các thay đổi khác có thể được đưa ra bằng cách đột biến trình tự nucleotit theo sáng chế từ đó dẫn đến thay đổi trong trình tự axit amin của protein diệt loài gây hại được mã hóa, mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học của protein. Do đó, phân tử axit nucleic phân lập biến thể có thể được tạo ra bằng cách đưa vào một hoặc nhiều việc thế, thêm, hoặc loại nucleotit trong trình tự nucleotit tương ứng được bộc lộ ở đây, sao cho một hoặc nhiều việc thế, thêm hoặc loại axit amin được đưa vào protein được mã hóa. Các đột biến có thể được đưa vào bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn, như đột biến điểm định vị và đột biến trung gian PCR. Trình tự nucleotit biến thể này cũng được bao gồm trong sáng chế.

Ví dụ, thế axit amin bảo toàn có thể được thực hiện ở một hoặc nhiều gốc axit amin không cơ bản, dự báo. Gốc axit amin “không cơ bản” là gốc mà có thể thay thế từ trình tự kiểu đại của protein diệt loài gây hại mà không làm thay đổi hoạt tính sinh học, trong khi gốc axit amin “cơ bản” cần cho hoạt tính sinh học. “Việc thế axit amin bảo toàn” là việc trong đó gốc axit amin được thay bởi gốc axit amin có mạch bên tương tự. Các họ của gốc axit amin có mạch bên tương tự được xác định trong lĩnh vực. Các họ này bao gồm axit amin có mạch bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), mạch bên axit (ví dụ, aspartic axit, glutamic axit), mạch bên phân cực không tích điện (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), mạch bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), mạch bên mạch nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và mạch bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin).

Thế axit amin có thể được thực hiện trong vùng không được bảo toàn mà vẫn giữ chức năng. Nhìn chung, việc thế này có thể không được thực hiện đối với các gốc axit amin bảo toàn, hoặc đối với các gốc axit amin ở trong mô típ được bảo toàn, khi các gốc này là cần thiết cho hoạt tính của protein. Các ví dụ về gốc mà được bảo toàn và có thể cần thiết cho hoạt tính của protein bao gồm, ví dụ, các gốc tương đồng giữa tất cả protein có trong sắp hàng của các độc tố tương tự hoặc liên quan với trình tự theo sáng chế (ví dụ, các gốc mà tương đồng trong sắp hàng của protein tương đồng). Các ví dụ về gốc mà

được bảo toàn nhưng có thể cho phép thể axit amin bảo toàn và vẫn giữ được hoạt tính bao gồm, ví dụ, gốc mà chỉ có thể bảo toàn giữa tất cả protein chứa trong sắp hàng của độc tố tương tự hoặc liên quan đến trình tự theo sáng chế (ví dụ, gốc mà chỉ có thể bảo toàn giữa tất cả protein chứa trong sắp hàng của protein tương đồng). Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực có thể hiểu rằng các biến thể chức năng có thể có sự thay thế được bảo toàn ít hoặc không được bảo toàn trong các gốc được bảo toàn.

Tùy ý, trình tự nucleotit biến thể có thể được thực hiện bằng cách đưa vào các đột biến một cách ngẫu nhiên dọc theo tất cả hoặc một phần trình tự mã hóa, như bằng cách gây đột biến bão hòa, và đột biến tạo thành có thể được sàng lọc khả năng tạo ra hoạt tính diệt loài gây hại để xác định các đột biến mà giữ được hoạt tính. Sau khi gây đột biến, protein được mã hóa có thể được biểu hiện bằng cách tái tổ hợp, và hoạt tính của protein có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật thử nghiệm tiêu chuẩn.

Sử dụng các phương pháp như PCR, lai, và phương pháp tương tự tương ứng với các trình tự diệt loài gây hại có thể được xác định, các trình tự này có sự tương đồng cơ bản với trình tự theo sáng chế. Tham khảo, ví dụ, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) và Innis, và cộng sự (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

Theo phương pháp lai, toàn bộ hoặc một phần trình tự nucleotit diệt loài gây hại có thể được sử dụng để sàng lọc cADN hoặc ngân hàng gen. Các phương pháp để cấu trúc cADN và ngân hàng gen này thường là đã biết trong lĩnh vực và được bộc lộ trong Sambrook and Russell, 2001, ở trên. Cái được gọi là mẫu dò lai có thể là các đoạn ADN bộ gen, các đoạn cADN, các đoạn ARN, hoặc oligonucleotit khác, và có thể được đánh dấu bằng nhóm có thể phát hiện được như ^{32}P , hoặc chất đánh dấu có thể phát hiện được khác, như các đồng vị phóng xạ khác, hợp chất huỳnh quang, enzym, hoặc nhân tố đồng-enzym. Các mẫu dò cho lai có thể được tạo ra bằng cách đánh dấu oligonucleotit tổng hợp trên cơ sở trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại đã biết được bộc lộ ở đây. Suy biến các đoạn môi được thiết kế trên cơ sở nucleotit bảo toàn hoặc các gốc axit amin trong trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin được mã hóa cũng có thể được dùng. Mẫu dò thường chứa vùng trình tự nucleotit mà lai dưới các điều kiện nghiêm ngặt với ít nhất khoảng 12, ít nhất khoảng 25, ít nhất khoảng 50, 75, 100, 125, 150, 175, hoặc 200 nucleotit liên tục của trình tự nucleotit mã hóa protein diệt loài gây hại theo sáng chế

hoặc đoạn hoặc biến thể của chúng. Các phương pháp tạo ra mẫu dò dùng cho lai thường là đã biết trong lĩnh vực và được bộc lộ trong Sambrook and Russell, 2001, ở trên được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ, toàn bộ trình tự diệt loài gây hại được bộc lộ ở đây, hoặc một hoặc nhiều phần của chúng, có thể được sử dụng làm mẫu dò có khả năng lai đặc hiệu với các trình tự giống protein diệt loài gây hại và các ARN thông tin tương ứng. Để thu được lai đặc hiệu dưới các điều kiện khác nhau, mẫu dò này bao gồm các trình tự đồng nhất và tốt hơn là có chiều dài ít nhất khoảng 10 nucleotit, hoặc có chiều dài ít nhất khoảng 20 nucleotit. Các mẫu lai có thể được sử dụng để khuếch đại trình tự diệt loài gây hại tương ứng từ cơ quan được chọn bằng PCR. Kỹ thuật này có thể được sử dụng để phân lập trình tự mã hóa bổ sung từ cơ quan mong muốn hoặc làm thử nghiệm chẩn đoán để xác định sự có mặt của trình tự mã hóa trong cơ quan. Kỹ thuật lai bao gồm lai sàng lọc ngân hàng ADN trải mỏng (bản hoặc cụm; tham khảo, ví dụ, Sambrook và cộng sự (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Do đó, sáng chế bao gồm các mẫu dò lai, cũng như trình tự nucleotit có khả năng lai với tất cả hoặc một phần của trình tự nucleotit theo sáng chế (ví dụ, ít nhất khoảng 300 nucleotit, ít nhất khoảng 400, ít nhất khoảng 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, hoặc đến chiều dài đầy đủ của trình tự nucleotit được bộc lộ ở đây). Việc lai của các trình tự này có thể được thực hiện dưới các điều kiện nghiêm ngặt. Thuật ngữ “các điều kiện nghiêm ngặt” hoặc “các điều kiện lai nghiêm ngặt” để chỉ các điều kiện mà ở đó mẫu dò sẽ lai với trình tự đích của nó đến mức dò lớn hơn trình tự khác (ví dụ, ít nhất gấp 2 lần trên nền). Các điều kiện nghiêm ngặt là phụ thuộc trình tự và sẽ khác nhau trong các hoàn cảnh khác nhau. Bằng cách kiểm soát sự nghiêm ngặt của việc lai và/hoặc các điều kiện rửa, các trình tự đích mà bổ sung 100% cho mẫu dò có thể được xác định (dò cùng loại). Tùy ý, các điều kiện nghiêm ngặt có thể được điều chỉnh để cho phép một số lỗi bắt cặp trong trình tự để cho mức tương đồng thấp hơn được dò (dò khác loại). Thông thường, mẫu dò có chiều dài ít hơn khoảng 900 nucleotit, tốt hơn là có chiều dài ít hơn 450 nucleotit.

Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt sẽ là các điều kiện mà trong đó nồng độ muối ít hơn khoảng 1,5 M Na ion, thường nằm trong khoảng nồng độ từ 0,01 đến 1,0 M Na ion (hoặc muối khác) ở độ pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,3 và nhiệt độ bằng ít

nhất khoảng 30°C đối với mẫu dò ngắn (ví dụ, nằm trong khoảng từ 10 đến 50 nucleotit) và ít nhất khoảng 60°C đối với mẫu dò dài (ví dụ, lớn hơn 50 nucleotit). Các điều kiện nghiêm ngặt còn có thể thu được bằng cách thêm các chất gây bất ổn định như formamit. Các điều kiện nghiêm ngặt thấp ví dụ bao gồm lai với dung dịch đệm nằm trong khoảng từ 30 đến 35% formamit, 1 M NaCl, 1% SDS (natri dodecyl sulphat) ở 37°C, và rửa trong khoảng từ 1X đến 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M trisatrat) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 55°C. Các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải ví dụ bao gồm lai trong khoảng từ 40 đến 45% formamit, 1,0 M NaCl, 1% SDS ở 37°C, và rửa trong khoảng từ 0,5X đến 1X SSC ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 60°C. Các điều kiện nghiêm ngặt cao ví dụ bao gồm lai trong 50% formamit, 1 M NaCl, 1% SDS ở 37°C, và rửa trong 0,1X SSC ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 65°C. Tùy ý, đệm rửa có thể chứa khoảng từ 0,1% đến 1% SDS. Thời gian lai thường ít hơn khoảng 24 giờ, thường nằm trong khoảng từ 4 đến 12 giờ.

Tính đặc hiệu thường là hàm rửa sau khi lai, các yếu tố quyết định là độ mạnh của ion và nhiệt độ của dung dịch rửa cuối. Đối với lai ADN-ADN, T_m có thể lấy xấp xỉ từ phương trình Meinkoth và Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ tạo ra}) - 500/L$; khi M là tỷ lệ chết của cation hóa trị một, %GC là phần trăm của guanosin and xytosin nucleotit trong ADN, % tạo thành là phần trăm của formamit trong dung dịch lai, và L là chiều dài của vật lai trong cặp bazơ. T_m là nhiệt độ (dưới độ mạnh của ion và pH được xác định) tại đó 50% trình tự đích bổ sung lai với mẫu dò bắt cặp tối ưu. T_m giảm khoảng 1°C cho mỗi 1% lỗi bắt cặp; do đó, T_m , lai, và/hoặc các điều kiện rửa có thể được điều chỉnh để lai các trình tự độ tương đồng mong muốn. Ví dụ, nếu trình tự là $\geq 90\%$ tương đồng được yêu cầu, T_m có thể giảm 10°C. Thông thường, các điều kiện nghiêm ngặt được chọn bằng khoảng 5°C thấp hơn điểm nóng chảy nhiệt (T_m) đối với trình tự cụ thể và phần bổ sung của nó tại độ mạnh của ion và pH được xác định. Tuy nhiên, các điều kiện rất nghiêm ngặt có thể sử dụng lai và/hoặc rửa ở 1, 2, 3, hoặc 4°C thấp hơn điểm nóng chảy nhiệt (T_m); các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải có thể sử dụng lai và/hoặc rửa ở 6, 7, 8, 9, hoặc 10°C thấp hơn điểm nóng chảy nhiệt (T_m); các điều kiện có tính nghiêm ngặt thấp có thể sử dụng lai và/hoặc rửa ở 11, 12, 13, 14, 15, hoặc 20°C thấp hơn điểm nóng chảy nhiệt (T_m). Sử dụng phương trình, lai và chế phẩm rửa, và T_m mong muốn, chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng các biến thể trong tính nghiêm ngặt của quá trình lai và/hoặc dung dịch rửa vốn đã

được mô tả. Nếu mức độ lỗi bắt cặp mong muốn tạo ra T_m là thấp hơn 45°C (dung dịch n: róc) hoặc 32°C (dung dịch formamit), được ưu tiên là làm tăng nồng độ SSC sao cho có thể sử dụng nhiệt độ cao hơn. Hướng dẫn duy nhất của lai axit nucleic được tìm thấy trong Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Phần I, Chương 2 (Elsevier, New York); và Ausubel và cộng sự, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chương 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Tham khảo Sambrook và cộng sự (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (tái bản lần thứ 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Protein được phân lập và các biến thể và các đoạn của chúng

Protein diệt loài gây hại cũng được bao gồm trong sáng chế. Thuật ngữ “protein diệt loài gây hại” để chỉ protein có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4. Các đoạn, phần hoạt tính sinh học, và các biến thể của chúng cũng được đề xuất, và có thể được sử dụng để thực hiện phương pháp theo sáng chế. “Protein phân lập” hoặc “protein tái tổ hợp” được sử dụng để đề cập đến protein mà không còn ở trong môi trường tự nhiên của nó, ví dụ trong ống nghiệm hoặc ở vi khuẩn tái tổ hợp hoặc tế bào chủ của cây.

“Các đoạn” hoặc “các phần hoạt tính sinh học” bao gồm các đoạn polypeptit chứa trình tự axit amin đủ tương đồng với trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4, và thể hiện hoạt tính diệt loài gây hại. Phần hoạt tính sinh học của protein diệt loài gây hại có thể là polypeptit mà có chiều dài, ví dụ, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, hoặc nhiều hơn axit amin. Phần hoạt tính sinh học này có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp và được đánh giá về hoạt tính diệt loài gây hại. Phương pháp để đo hoạt tính diệt loài gây hại là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews và cộng sự (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone và cộng sự (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và Sáng chế Mỹ số 5,743,477; và Heong và cộng sự (2013) *Research methods in toxicology and insecticide resistance monitoring of rice planthoppers*, tái bản lần thứ 2, Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Như được sử dụng ở đây, đoạn bao gồm ít nhất 8 axit amin liên kế nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4. Sáng chế bao gồm các đoạn khác, tuy nhiên, đoạn bất kỳ

trong protein có chiều dài lớn hơn khoảng 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, hoặc nhiều hơn axit amin.

Thuật ngữ “các biến thể” để chỉ protein hoặc polypeptit có trình tự axit amin mà có ít nhất khoảng 60%, 65%, khoảng 70%, 75%, khoảng 80%, 85%, khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tương đồng với trình tự axit amin của bất kỳ trình tự nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4. Các biến thể còn bao gồm polypeptit được mã hóa bởi phân tử axit nucleic mà lai với phân tử axit nucleic nêu ở SEQ ID NO:1-2, hoặc phần bổ sung của chúng, dưới các điều kiện nghiêm ngặt. Các biến thể bao gồm polypeptit mà khác về trình tự axit amin do việc gây đột biến. Protein biến thể được bao gồm bởi sáng chế là hoạt tính sinh học, tức là chúng tiếp tục sở hữu hoạt tính sinh học mong muốn của protein tự nhiên, tức là, giữ được hoạt tính diệt loài gây hại. Theo một số phương án, các biến thể có hoạt tính cải thiện so với protein tự nhiên. Phương pháp để đo hoạt tính diệt loài gây hại là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews và cộng sự (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone và cộng sự (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; và Sáng chế Mỹ số 5,743,477; và Heong và cộng sự (2013) *Research methods in toxicology and insecticide resistance monitoring of rice planthoppers, tái bản lần thứ 2*, Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Gen vi khuẩn, như gen *axmi* theo sáng chế, sở hữu khá thường xuyên mã khởi đầu methiorin đa gần với khởi đầu của khung đọc mở. Thường thường, khởi đầu dịch mã ở một hoặc nhiều trong số các mã khởi đầu này sẽ dẫn đến việc tạo ra protein chức năng. Các mã khởi đầu này có thể bao gồm mã ATG. Tuy nhiên, vi khuẩn như *Bacillus sp.* còn nhận diện mã GTG là mã khởi đầu, và protein mà khởi đầu dịch mã ở mã GTG chứa methionin ở axit amin đầu tiên. Trong các trường hợp hiếm, dịch mã trong hệ vi khuẩn có thể khởi đầu ở mã TTG, mặc dù trong trường hợp này TTG mã hóa methionin. Hơn nữa, không thường xuyên xác định *theo cách suy diễn* là các mã này được sử dụng tự nhiên trong vi khuẩn. Do đó, cần hiểu rằng việc sử dụng một trong số các mã methionin thay thế có thể còn dẫn đến việc tạo ra protein diệt loài gây hại. Protein diệt loài gây hại này được bao gồm theo sáng chế và có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế. Cũng cần hiểu rằng, khi được biểu hiện ở cây, cần phải thay thế mã khởi đầu thay thế thành ATG để dịch mã đúng.

Theo nhiều phương án khác nhau của sáng chế, protein diệt loài gây hại chứa trình tự axit amin suy từ trình tự nucleotit có chiều dài đầy đủ được bộc lộ ở đây, và trình tự axit amin mà ngắn hơn trình tự có chiều dài đầy đủ do sử dụng điểm bắt đầu xuôi dòng thay thế.

Các kháng thể đối với polypeptit theo sáng chế, hoặc đối với các biến thể hoặc các đoạn của chúng, cũng được bao gồm. Phương pháp tạo ra các kháng thể là đã biết trong lĩnh vực (tham khảo, ví dụ, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; Sáng chế Mỹ số 4,196,265).

Do đó, một khía cạnh theo sáng chế đề cập đến kháng thể, phân tử liên kết kháng nguyên mạch đơn, hoặc protein khác mà liên kết đặc hiệu với một hoặc nhiều trong số các protein hoặc phân tử peptit theo sáng chế và các chất tương đồng của chúng, các dung hợp hoặc các đoạn. Theo phương án được ưu tiên đặc biệt, kháng thể liên kết đặc biệt với protein có trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4 hoặc đoạn của chúng. Theo một phương án khác, kháng thể liên kết đặc biệt với protein dung hợp chứa trình tự axit amin được chọn từ trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4 hoặc đoạn của chúng.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng để dò định tính hoặc định lượng protein hoặc phân tử peptit theo sáng chế, hoặc dò các biến đổi sau dịch mã của protein. Như được sử dụng ở đây, kháng thể hoặc peptit được nói là "liên kết đặc biệt" với protein hoặc phân tử peptit theo sáng chế nếu liên kết này không bị ức chế một cách cạnh tranh bởi sự có mặt của các phân tử không liên quan.

Các biến thể được biến đổi hoặc cải thiện

Phát hiện ra rằng trình tự ADN của protein diệt loài gây hại có thể được thay thế bằng nhiều phương pháp khác nhau, và các sự thay thế này có thể xảy ra trong trình tự ADN mã hóa protein có trình tự axit amin khác trình tự mà được mã hóa bởi protein diệt loài gây hại theo sáng chế. Protein này có thể được thay thế theo nhiều cách khác nhau bao gồm thế, loại, cắt cụt, và chèn axit amin của một hoặc nhiều axit amin nêu ở SEQ ID NO:3 hoặc 4, bao gồm đến khoảng 2, khoảng 3, khoảng 4, khoảng 5, khoảng 6, khoảng 7, khoảng 8, khoảng 9, khoảng 10, khoảng 15, khoảng 20, khoảng 25, khoảng 30, khoảng 35, khoảng 40, khoảng 45, khoảng 50, khoảng 55, khoảng 60, khoảng 65, khoảng 70, khoảng 75, khoảng 80, khoảng 85, khoảng 90, khoảng 100, khoảng 105, khoảng 110,

khoảng 115, khoảng 120, khoảng 125, khoảng 130, khoảng 135, khoảng 140, khoảng 145, khoảng 150, khoảng 155, hoặc nhiều hơn thế, loại hoặc chèn axit amin. Các phương pháp cho các thao tác này thường là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, trình tự axit amin các biến thể của protein diệt loài gây hại có thể được điều chế bằng các đột biến trong ADN. Việc này cũng có thể được thử hiện bởi một trong một số dạng đột biến và/hoặc tiến hóa định hướng. Theo một số khía cạnh, thay đổi được mã hóa trong trình tự axit amin sẽ cơ bản không ảnh hưởng đến chức năng của protein. Các biến thể này sẽ có hoạt tính diệt loài gây hại mong muốn. Tuy nhiên, cần hiểu rằng khả năng của protein diệt loài gây hại để tạo ra hoạt tính diệt loài gây hại có thể được cải thiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật này cho các chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, có thể biểu hiện protein diệt loài gây hại trong tế bào chủ mà thể hiện tỷ lệ không hợp nhất bazơ cao trong sao chép ADN, như XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Sau khi nhân giống ở các chủng này, có thể phân lập ADN (ví dụ bằng cách tạo ra ADN plasmit, hoặc bằng cách khuếch đại bằng PCR và tách dòng đoạn PCR tạo thành vào vector), nuôi cấy các đột biến protein diệt loài gây hại trong chủng không gây đột biến, và xác định gen được đột biến có hoạt tính diệt loài gây hại, ví dụ bằng cách thực hiện thử nghiệm để thử hoạt tính diệt loài gây hại. Thông thường, protein được trộn lẫn và được sử dụng trong các thử nghiệm ăn vào. Tham khảo, ví dụ Marrone và cộng sự (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Các thử nghiệm có thể bao gồm việc cho cây tiếp xúc với một hoặc nhiều loài gây hại và xác định khả năng sống sót của cây và/hoặc chết ở loài gây hại. Các ví dụ về đột biến mà tạo ra độc tố tăng được tìm thấy trong Schnepf và cộng sự (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Tùy ý, thay đổi có thể được thực hiện cho trình tự protein có nhiều protein ở đầu amin hoặc carboxy mà cơ bản không ảnh hưởng hoạt tính. Thay đổi này có thể bao gồm chèn, loại, hoặc thay thế được đưa vào bằng các phương pháp phân tử hiện đại, như PCR, bao gồm khuếch đại PCR mà thay đổi hoặc mở rộng trình tự mã hóa protein do chứa các trình tự mã hóa axit amin trong oligonucleotit được sử dụng trong khuếch đại PCR. Tùy ý, các trình tự protein được thêm có thể bao gồm các trình tự mã hóa protein toàn bộ, như các trình tự thường được sử dụng trong lĩnh vực để tạo ra dung hợp protein. Protein dung hợp này thường được sử dụng để (1) làm tăng biểu hiện protein mong muốn (2) đưa vào vùng liên kết, hoạt tính enzym, hoặc epitop để tạo điều kiện cho hoặc là tinh chế protein, dò protein, hoặc sử dụng thử nghiệm khác đã biết trong lĩnh vực (3) chất tiết đích hoặc

dịch mã protein vào cơ quan dưới tế bào, như không gian chất bào của vi khuẩn âm Gram, hoặc lưới nội bào của tế bào nhân chuẩn, chhungs thường tạo ra glycosyl hóa protein.

Nucleotit và trình tự axit amin biến thể theo sáng chế còn bao gồm các trình tự dẫn xuất từ các quá trình tái tổ hợp và đột biến gen như tái tổ hợp ADN. Với các quá trình này, một hoặc nhiều vùng mã hóa protein diệt loài gây hại khác nhau có thể được sử dụng để tạo ra protein diệt loài gây hại mới có các đặc tính mong muốn. Theo cách này, ngân hàng polynucleotit tái tổ hợp được tạo ra từ quần thể polynucleotit trình tự liên quan bao gồm vùng trình tự mà có sự tương đồng trình tự cơ bản và có thể là tái tổ hợp cùng loại *trong ống nghiệm* hoặc *trong cơ thể*. Ví dụ, sử dụng nghiên cứu này, các mô típ trình tự mã hóa vùng mong muốn có thể được sắp xếp lại trật tự giữa gen diệt loài gây hại theo sáng chế và các gen diệt loài gây hại đã biết khác để thu được gen mới mã hóa protein có đặc tính cải thiện mong muốn, như làm tăng hoạt tính diệt loài gây hại. Các chiến lược để sắp xếp lại trật tự ADN này là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer và cộng sự (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore và cộng sự (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang và cộng sự (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Cramer và cộng sự (1998) *Nature* 391:288-291; và Sáng chế Mỹ số 5,605,793 và 5,837,458.

Kỹ thuật hoán đổi và sắp xếp lại trật tự miền là một cơ chế khác để tạo ra protein diệt loài gây hại được cải biến. Các vùng có thể được hoán đổi giữa protein diệt loài gây hại, tạo ra vật lai hoặc độc tố khảm có hoạt tính diệt loài gây hại hoặc phổ đích cải thiện. Các phương pháp tạo ra protein tái tổ hợp và thử nghiệm chúng về hoạt tính diệt loài gây hại là đã biết trong lĩnh vực (tham khảo, ví dụ, Naimov và cộng sự (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd và cộng sự (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge và cộng sự (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf và cộng sự (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang và cộng sự (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Các vector

Trình tự diệt loài gây hại theo sáng chế có thể được đề xuất trong cat-xet biểu hiện để biểu hiện ở cây mong muốn. Thuật ngữ “cat-xet biểu hiện của cây” để chỉ cấu trúc

ADN mà có khả năng tạo ra biểu hiện của protein từ khung đọc mở ở tế bào cây. Thông thường chúng chứa gen khởi động và trình tự mã hóa. Thường thường, các cấu trúc này sẽ còn chứa vùng không được dịch mã 3'. Các cấu trúc này có thể chứa “trình tự tín hiệu” hoặc “trình tự dẫn” để tạo điều kiện cho việc vận chuyển peptit đồng dịch mã hoặc sau dịch mã đến một số cấu trúc ngoài tế bào nhất định như lập lục (hoặc lập thể khác), lưới nội bào, hoặc bộ máy Golgi.

Thuật ngữ “trình tự tín hiệu” để chỉ trình tự đã biết hoặc nghi ngờ tạo ra vận chuyển peptit đồng dịch mã hoặc sau dịch mã qua màng tế bào. Trong các tế bào nhân chuẩn, thường có sự bài tiết vào bộ máy Golgi, với một số glycosyl hóa thu được. Các độc tố diệt côn trùng của vi khuẩn thường được tổng hợp là protoxin, mà hoạt hóa thủy phân trong ruột của côn trùng đích (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). Theo một số phương án của sáng chế, trình tự tín hiệu nằm trong trình tự tự nhiên, hoặc có thể được dẫn xuất từ trình tự theo sáng chế. Thuật ngữ “trình tự dẫn” để chỉ trình tự bất kỳ mà khi được dịch mã, tạo ra trình tự axit amin đủ để phát động vận chuyển đồng dịch mã mạch peptit đến cơ quan dưới tế bào. Do đó, nó bao gồm các trình tự dẫn nhắm đến vận chuyển và/hoặc glycosyl hóa bằng cách đi qua vào lưới nội bào, đi qua không bào, plastit bao gồm lập lục, ty thể, và tương tự.

Thuật ngữ “vector biến đổi gen của cây” để chỉ phân tử ADN mà cần cho sự biến đổi gen hiệu quả của tế bào cây. Phân tử này có thể chứa một hoặc nhiều cat-xet biểu hiện của cây, và có thể được tổ chức thành nhiều hơn một phân tử ADN “vector”. Ví dụ, các vector hai kỳ là vector biến đổi gen của cây mà sử dụng hai vector ADN không liền kề để mã hóa tất cả các chức năng đóng vai trò cis và trans cần để biến đổi gen của tế bào cây (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). “Vector” đề cập đến cấu trúc axit nucleic được thiết kế để chuyển giữa các tế bào chủ khác nhau. “Vector biểu hiện” đề cập đến vector có khả năng hợp nhất, tích hợp và biểu hiện trình tự ADN khác loại hoặc các đoạn ở tế bào ngoại. Cat-xet sẽ bao gồm các trình tự điều biến 5' và/hoặc 3' liên kết hoạt động với trình tự theo sáng chế. Thuật ngữ “liên kết hoạt động” để chỉ liên kết chức năng giữa gen khởi động và trình tự thứ hai, trong đó trình tự gen khởi động khởi động và trung gian cho phiên mã trình tự ADN tương ứng với trình tự thứ hai. Thông thường, liên kết hoạt động nghĩa là trình tự axit nucleic được liên kết là liền kề và, khi cần tham gia vào hai vùng mã hóa protein, liền kề và trong cùng khung đọc.

Cat-xet có thể chứa thêm ít nhất một gen bổ sung để đồng biến đổi gen vào sinh vật. Tùy ý, (các) gen bổ sung có thể được cho trên nhiều cat-xet biểu hiện.

Theo nhiều phương án khác nhau, trình tự nucleotit theo sáng chế liên kết hoạt động với gen khởi động, ví dụ, gen khởi động của cây. “Gen khởi động” đề cập đến trình tự axit nucleic mà thực hiện chức năng định hướng phiên mã của trình tự mã hóa xuôi dòng. Gen khởi động cùng với trình tự axit nucleic điều biến phiên mã và dịch mã khác (còn gọi là “trình tự kiểm soát”) là cần thiết để biểu hiện trình ADN mong muốn.

Cat-xet biểu hiện này có nhiều điểm giới hạn để chèn trình tự diệt loài gây hại dưới sự điều biến phiên mã của vùng điều biến.

Cat-xet biểu hiện sẽ bao gồm theo hướng 5'-3' của phiên mã, vùng khởi đầu phiên mã và dịch mã (cụ thể là, gen khởi động), trình tự ADN theo sáng chế, và vùng kết thúc phiên mã và dịch mã (cụ thể là, vùng kết thúc) chức năng ở cây. Gen khởi động có thể tự nhiên hoặc tương tự, hoặc bên ngoài hoặc khác loại, với vật chủ cây và/hoặc với trình tự ADN theo sáng chế. Ngoài ra, gen khởi động có thể là trình tự tự nhiên hoặc tùy ý là trình tự tổng hợp. Khi gen khởi động là “tự nhiên” hoặc “cùng loại” với vật chủ cây, nghĩa là gen khởi động được tìm thấy ở cây tự nhiên mà gen khởi động được đưa vào. Khi gen khởi động “ở ngoài” hoặc “khác loại” với trình tự ADN theo sáng chế, nghĩa là gen khởi động không tự nhiên hoặc gen khởi động xảy ra trong tự nhiên đối với trình tự ADN liên kết hoạt động theo sáng chế.

Vùng kết thúc có thể tự nhiên có vùng khởi đầu phiên mã, có thể là tự nhiên có trình tự ADN liên kết hoạt động mong muốn, có thể là tự nhiên với cây chủ, hoặc có thể được chiết xuất từ nguồn khác (cụ thể là, bên ngoài hoặc khác loại với gen khởi động, trình tự ADN mong muốn, vật chủ cây, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng). Các vùng kết thúc thích hợp được lấy từ Ti-plasmit của *A. tumefaciens*, như vùng kết thúc octopine syntaza và nopaline syntaza. Cũng tham khảo Guerineau và cộng sự (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon và cộng sự (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen và cộng sự (1990) *Tế bào cây* 2:1261-1272; Munroe và cộng sự (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas và cộng sự (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; và Joshi và cộng sự (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Khi thích hợp, (các) gen có thể được tối ưu hóa để tăng biểu hiện trong tế bào chủ chuyển gen. Tức là, các gen có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các mã ưu tiên tế bào chủ để cải thiện biểu hiện, hoặc có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng mã với tần

suất sử dụng mã ưu tiên vật chủ. Thông thường, hàm lượng GC của gen sẽ tăng. Tham khảo, ví dụ, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 để bàn về việc sử dụng mã ưu tiên vật chủ. Các phương pháp là đã biết trong lĩnh vực tổng hợp gen ưu tiên cây. Tham khảo, ví dụ, Sáng chế Mỹ số 5,380,831, và 5,436,391, Công bố đơn Sáng chế Mỹ số 20090137409, và Murray và cộng sự (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, protein diệt loài gây hại nhắm đến lap lục để biểu hiện. Theo cách này, khi protein diệt loài gây hại không được chèn trực tiếp vào lap lục, cat-xet biểu hiện sẽ còn chứa axit nucleic mã hóa peptit chuyển tiếp để hướng protein diệt loài gây hại đến các lap lục. Các peptit chuyển tiếp này là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Von Heijne và cộng sự (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark và cộng sự (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa và cộng sự (1987) *Plant Physiol.* 84:965-958; Romer và cộng sự (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; và Shah và cộng sự (1986) *Science* 233:478-481.

Gen diệt loài gây hại được nhắm đến lap lục có thể được tối ưu hóa để biểu hiện trong lap lục để tính sự khác nhau trong việc sử dụng mã giữa hạt nhân của cây và cơ quan tế bào này. Theo cách này, axit nucleic mong muốn có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng mã ưu tiên lap lục. Tham khảo, ví dụ, Sáng chế Mỹ số 5,380,831, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Biến đổi gen ở cây

Các phương pháp theo sáng chế liên quan đến việc đưa cấu trúc nucleotit vào cây. Thuật ngữ “đưa vào” để chỉ việc làm cấu trúc nucleotit có mặt ở cây theo cách sao cho các hạt cấu trúc đi vào bên trong của tế bào của cây. Các phương pháp theo sáng chế không đòi hỏi sử dụng phương pháp cụ thể để đưa cấu trúc nucleotit vào cây, chỉ cần các hạt cấu trúc nucleotit đi vào bên trong của ít nhất một tế bào của cây. Phương pháp đưa cấu trúc nucleotit vào cây là đã biết trong lĩnh vực bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp biến đổi gen ổn định, các phương pháp biến đổi gen chuyển tiếp, và các phương pháp qua trung gian virus.

Thuật ngữ “cây” để chỉ toàn bộ cây, bộ phận của cây (ví dụ, lá, thân, rễ, v.v.), hạt, tế bào cây, cây con, phôi và thể hện con của cây. Tế bào cây có thể được phân biệt hoặc

không phân biệt (ví dụ thể sần, tế bào nuôi cấy huyền phù, thể nguyên sinh, tế bào lá, tế bào rễ, tế bào libe, phấn hoa).

“Cây chuyển gen” hoặc “cây biến đổi gen” hoặc cây hoặc tế bào hoặc mô “biến đổi gen ổn định” đề cập đến cây mà được kết hợp hoặc được tích hợp trình tự axit nucleic hoặc các đoạn ADN ngoại sinh vào tế bào cây. Các trình tự axit nucleic này bao gồm các trình tự ngoại sinh, hoặc không có mặt ở cây không biến đổi gen, cũng như các trình tự mà có thể là nội sinh, hoặc có mặt ở cây không biến đổi gen. Thuật ngữ “khác loại” thường đề cập đến trình tự axit nucleic không phải nội sinh với tế bào hoặc một phần của bộ gen tự nhiên mà chúng có mặt trong đó, và được thêm vào tế bào bằng cách gây nhiễm, chuyển nhiễm, vi nhiễm, điện di, chiếu ảnh, hoặc tương tự.

Cây chuyển gen theo sáng chế biểu hiện một hoặc nhiều trong số các trình tự độc tố mới được bộc lộ ở đây. Theo nhiều phương án khác nhau, cây chuyển gen còn bao gồm một hoặc nhiều gen bổ sung để kháng côn trùng (ví dụ, Cry1, như các thành viên của các họ Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, và Cry1F; Cry2, như các thành viên của họ Cry2A; Cry9, như các thành viên của các họ Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E, và Cry9F; v.v.). Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng cây chuyển gen có thể chứa gen bất kỳ mang đặc điểm nông hóa mong muốn.

Sự biến đổi gen của tế bào cây có thể thu được bằng một trong số vài kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực. Gen diệt loài gây hại theo sáng chế có thể được biến đổi để thu được hoặc tăng cường biểu hiện ở tế bào cây. Thông thường cấu trúc mà biểu hiện protein này có thể chứa gen khởi động để dẫn hướng sự phiên mã gen, cũng như vùng không dịch mã 3' để cho phép kết thúc phiên mã và quá trình polyadenyl hoá. Tổ chức của cấu trúc này là đã biết trong lĩnh vực. Trong một số trường hợp, có thể hữu dụng để thiết kế gen sao cho peptit thu được được tiết ra, hoặc nếu không được nhắm đích trong tế bào cây. Ví dụ, gen có thể được thiết kế để chứa peptit tín hiệu để tạo điều kiện cho việc chuyển peptit đến lưới nội bào. Cũng có thể được ưu tiên là thiết kế cat-xet biểu hiện của cây chứa intron, sao cho xử lý mARN của intron cần cho việc biểu hiện.

Thông thường “cat-xet biểu hiện của cây” này sẽ được chèn vào “vector chuyển gen của cây”. Vector chuyển gen của cây có thể chứa một hoặc nhiều vector ADN cần để thu được biến đổi gen của cây. Ví dụ, thông thường trong lĩnh vực người ta sử dụng vector chuyển gen của cây mà chứa nhiều hơn một mảnh ADN liên kề. các vector này thường được đề cập trong lĩnh vực là “vector hai kỳ.” Vector hai kỳ cũng như các vector có plasmit

trợ giúp thường được sử dụng để biến đổi gen được trung gian bởi *Agrobacterium*, khi kích thước và sự phức tạp của các đoạn ADN cần để thu được sự chuyển gen hiệu quả là khá lớn, và nó có lợi để tách biệt các chức năng trên các phân tử ADN riêng biệt. Vector hai kỳ thông thường contain chứa vector plasmit mà chứa các trình tự đóng vai trò cis cần để chuyển T-ADN (như mép trái và mép phải), gen đánh dấu chọn lọc mà được thiết kế để có thể biểu hiện ở tế bào cây, và “gen mong muốn” (gen được thiết kế để có khả năng biểu hiện ở tế bào cây mà thể hệ cây chuyển gen mong muốn). Cũng có mặt trên vector plasmit này là các trình tự cần để sao chép vi khuẩn. Trình tự đóng vai trò cis được sắp hàng theo cách để cho phép chuyển hiệu quả vào tế bào cây và biểu hiện trong đó. Ví dụ, gen đánh dấu chọn lọc và gen diệt loài gây hại nằm giữa mép trái và mép phải. Thường thường vector plasmit thứ hai chứa yếu tố đóng vai trò trans làm trung gian chuyển T-ADN từ *Agrobacterium* sang tế bào cây. Plasmit này thường chứa các chức năng tính độc (gen Vir) cho phép gây nhiễm tế bào cây bằng *Agrobacterium*, và chuyển ADN bằng cách phân cắt ở các trình tự mép và chuyển ADN trung gian bởi virus, như được hiểu trong lĩnh vực (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Một số loại của chủng *Agrobacterium* (ví dụ LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, v.v.) có thể được sử dụng để biến đổi gen ở cây. Vector plasmit thứ hai không cần để biến đổi cây bằng các phương pháp khác như chiếu ảnh, vi nhiễm, điện di, polyetylen glycol, v.v.

Thông thường, phương pháp biến đổi gen ở cây liên quan đến việc chuyển ADN khác loại vào tế bào cây đích (ví dụ phôi non hoặc trưởng thành, nuôi cấy huyền phù, thể sần không phân biệt, thể nguyên sinh, v.v.), tiếp theo áp dụng mức ngưỡng tối đa chọn lọc thích hợp (phụ thuộc vào gen đánh dấu chọn lọc) để lấy tế bào cây được biến đổi gen ra khỏi nhóm khối tế bào không biến đổi gen. Mảnh cấy thường được chuyển sang kho mới có cùng môi trường và được nuôi cấy theo cách thông thường. Sau đó, tế bào được biến đổi gen được phân biệt thành các chồi sau khi đặt lên môi trường rethể hệ được bổ sung với mức ngưỡng tối đa chất chọn lọc. Sau đó các chồi được chuyển đến môi trường tạo rễ chọn lọc để lấy chồi đã đâm rễ hoặc cây non. Cây non chuyển gen sau đó được nuôi thành cây trưởng thành và tạo ra hạt sinh sản (ví dụ Hiei và cộng sự (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida và cộng sự (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Mảnh cấy thường được chuyển sang kho mới có cùng môi trường và được nuôi cấy theo cách thông thường. Mô tả chung về các kỹ thuật và phương pháp để tạo ra cây chuyển gen được tìm thấy trong Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-

239 và Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Vì vật liệu chuyển gen chứa nhiều tế bào; cả các tế bào biến đổi gen và không biến đổi gen đều có mặt ở mảnh bất kỳ của đích thể sần hoặc mô hoặc nhóm tế bào được nhắm đến. Khả năng diệt các tế bào không biến đổi gen và cho phép tế bào biến đổi gen tăng sinh tạo ra nuôi cấy cây biến đổi gen. Thường thường, khả năng loại tế bào không biến đổi gen là giới hạn cho việc lấy lại tế bào cây biến đổi gen và tạo thành công cây chuyển gen.

Các nguyên tắc biến đổi gen cũng như các nguyên tắc để đưa trình tự nucleotit vào cây có thể khác nhau phụ thuộc vào loại cây hoặc tế bào cây, cụ thể là, một lá mầm hoặc hai lá mầm, được nhắm đến biến đổi gen. Việc tạo ra cây chuyển gen có thể được thực hiện bằng một trong số vài phương pháp, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vi nhiễm, electroporation, chuyển gen trực tiếp, đưa ADN khác loại bởi *Agrobacterium* vào tế bào cây (biến đổi gen được trung gian bởi *Agrobacterium*), phá hủy tế bào cây với ADN bên ngoài khác loại được gắn vào hạt, thúc đẩy bắn hạt, biến đổi chùm sol khí (Đơn sáng chế Mỹ được công bố số 20010026941; Sáng chế Mỹ số 4,945,050; Công bố đơn quốc tế số WO 91/00915; Đơn sáng chế Mỹ được công bố số 2002015066), biến đổi gen Lec1, và các phương pháp trung gian-trực tiếp không qua hạt khác để chuyển ADN.

Phương pháp biến đổi gen của lựa chọn là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ, Svab và cộng sự (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Phương pháp gắn liền với súng bắn gen của ADN chứa gen đánh dấu chọn lọc và nhắm ADN đến bộ gen plastit thông qua tái tổ hợp cùng loại. Ngoài ra, biến đổi gen plastit có thể thu được bằng cách chuyển hoạt tính của chuyển gen đường plastit cân bằng cách biểu hiện ưu tiên mô của ARN polymeraza hướng plastit và mã hóa hạt nhân. Hệ này được báo cáo trong McBride và cộng sự (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Sau khi cấy ADN bên ngoài khác loại vào tế bào cây, sau đó áp dụng mức ngưỡng tối đa chọn lọc thích hợp trong môi trường để diệt các tế bào không biến đổi gen và tách và tăng sinh các tế bào được coi là biến đổi gen mà sống sót từ xử lý chọn lọc bằng cách chuyển dần sang môi trường mới. Bằng cách đưa qua liên tục và thử thách với chọn lọc thích hợp, người ta xác định và tăng sinh các tế bào đã biến đổi gen bằng vector plasmit. Các phương pháp phân tử và sinh hóa có thể sau đó được sử dụng để xác nhận sự có mặt của gen khác loại được cấy mong muốn vào bộ gen của cây chuyển gen.

Các tế bào được biến đổi gen có thể được nuôi lớn thành cây theo phương pháp thông thường. Tham khảo, ví dụ, McCormick và cộng sự (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Các cây này sau đó có thể được nuôi, và hoặc là được thụ phấn với cùng chủng được biến đổi gen hoặc chủng khác, và lai thu được có biểu hiện cơ bản của đặc tính kiểu hình mong muốn đã xác định. Hai hoặc nhiều thế hệ có thể được trồng để đảm bảo rằng biểu hiện của đặc tính kiểu hình mong muốn được duy trì và di truyền ổn định và sau đó các hạt giống được thu để đảm bảo thu được biểu hiện của đặc tính kiểu hình mong muốn. Theo cách này, sáng chế đề xuất hạt giống biến đổi gen (còn gọi là “hạt giống chuyển gen”) có cấu trúc nucleotit theo sáng chế, ví dụ, cat-xet biểu hiện theo sáng chế, được kết hợp ổn định vào bộ gen của chúng.

Đánh giá sự biến đổi cây

Sau khi đưa ADN bên ngoài khác loại vào tế bào cây, sự biến đổi gen hoặc tích hợp gen khác loại trong bộ gen của cây được xác nhận bằng nhiều phương pháp khác nhau như phân tích axit nucleic, protein và các chất chuyển hóa liên quan đến gen được tích hợp.

Phân tích PCR là phương pháp sàng lọc nhanh các tế bào biến đổi gen, mô hoặc chồi đối với sự có mặt của gen tích hợp ở giai đoạn sớm hơn trước khi trồng sang đất (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi oligonucleotit đặc hiệu cho gen mong muốn hoặc nền vector *Agrobacterium*, v.v.

Biến đổi gen ở cây có thể được xác nhận bằng phân tích điểm Southern blot của ADN bộ gen (Sambrook and Russell, 2001, ở trên). Thông thường, tổng ADN được chiết từ phần biến đổi gen, tự hoại bằng các enzym giới hạn thích hợp, chia đoạn trong agarosa và được chuyển đến nitrocellulose hoặc màng ni-lông. Màng hoặc “điểm” sau đó được dò bằng, ví dụ, đoạn ADN đích ^{32}P được đánh dấu đồng vị phóng xạ để xác nhận sự tích hợp của gen được đưa vào trong bộ gen của cây theo các kỹ thuật tiêu chuẩn (Sambrook and Russell, 2001, ở trên).

Theo phân tích điểm Northern blot, ARN được phân lập từ các mô cụ thể của phần biến đổi gen, được chia đoạn trong formaldehyt agarosa gel, và tạo điểm lên chất lọc ni-lông theo các quy trình tiêu chuẩn mà thường được dùng trong lĩnh vực (Sambrook and

Russell, 2001, ở trên). Biểu hiện của ARN được mã hóa bởi gen diệt loài gây hại sau đó được thử bằng cách lai chất lọc với mẫu dò phóng xạ dẫn xuất từ gen diệt loài gây hại, bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực (Sambrook and Russell, 2001, ở trên).

Các thử nghiệm điểm sinh hóa, Western blot và tương tự có thể được thực hiện trên cây chuyển gen để xác nhận sự có mặt của protein được mã hóa bởi gen diệt loài gây hại bằng các quy trình tiêu chuẩn (Sambrook and Russell, 2001, ở trên) sử dụng các kháng thể mà liên kết với một hoặc nhiều epitop có mặt trên diệt loài gây hại.

Hoạt tính diệt loài gây hại ở cây

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, có thể tạo ra cây chuyển gen biểu hiện protein diệt loài gây hại mà có hoạt tính diệt loài gây hại. Các phương pháp được mô tả ở trên bằng ví dụ có thể được sử dụng để tạo ra cây chuyển gen, nhưng cách mà trong đó tế bào cây chuyển gen được tạo ra không giới hạn sáng chế. Các phương pháp đã biết hoặc được mô tả trong lĩnh vực như biến đổi gen trung gian bởi *Agrobacterium*, biến đổi gen bằng phương pháp bắn gen, và phương pháp trung gian không qua hạt có thể được sử dụng tùy theo vật thí nghiệm. Cây biểu hiện protein diệt loài gây hại có thể được phân lập bằng phương pháp thông thường được mô tả trong lĩnh vực, ví dụ biến đổi gen của thể sản, chọn lọc thể sản được biến đổi gen, và lại tạo ra cây sinh sản từ thể sản chuyển gen này. Theo quy trình này, có thể sử dụng gen bất kỳ làm gen đánh dấu chọn lọc miễn là biểu hiện của nó trong tế bào cây tạo ra khả năng xác định hoặc chọn lọc các tế bào biến đổi gen.

Nhiều chất đánh dấu đã được phát triển để sử dụng với tế bào cây, như chất kháng chloramphenicol, aminoglycosit G418, hygromyxin, hoặc tương tự. Các gen khác mà mã hóa sản phẩm tha gia vào chuyển hóa lập lục cũng có thể được sử dụng làm chất đánh dấu chọn lọc. Ví dụ, các gen mà có khả năng kháng chất diệt cỏ thực vật như Glyphosat, bromoxynil, hoặc imidazolinon có thể được dùng cụ thể. Các gen này đã được báo cáo (Stalker và cộng sự (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (gen nitrilaza kháng bromoxynil); và Sathasivan và cộng sự (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (gen kháng AHAS imidazolinon). Ngoài ra, các gen được bộc lộ ở đây hữu dụng làm chất đánh dấu để đánh giá sự biến đổi gen của vi khuẩn hoặc tế bào cây. Các phương pháp phát hiện sự có mặt của chuyển gen ở cây, cơ quan của cây (ví dụ, lá, thân, rễ, v.v.), hạt, tế bào cây, cây con, phôi hoặc thể hệ con của chúng là đã biết trong lĩnh vực. Theo một phương án,

sự có mặt của chuyển gen được phát hiện bằng cách thử nghiệm hoạt tính diệt loài gây hại.

Cây sinh sản biểu hiện protein diệt loài gây hại có thể được thử nghiệm hoạt tính diệt loài gây hại, và cây thể hiện hoạt tính tối ưu được chọn để sinh sản tiếp. Các phương pháp có trong lĩnh vực để thử nghiệm hoạt tính diệt loài gây hại. Thông thường, protein được trộn lẫn và sử dụng trong thử nghiệm phá hoại. Tham khảo, ví dụ Marrone và cộng sự (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Sáng chế có thể được sử dụng để biến đổi gen của loài thực vật bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cây một lá mầm và cây hai lá mầm. Các ví dụ về cây mong muốn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngô (bắp), lúa miến, lúa mì, hướng dương, cà chua, cây họ cải, hạt tiêu, khoai tây, bông, lúa, đậu nành, củ cải đường, mía đường, thuốc lá, lúa mạch, và cây hạt cải dầu, *Brassica* sp., cỏ linh lăng, lúa mạch đen, kê, cây rum, lạc, khoai lang, sắn, cà phê, dừa, dứa, cây họ cam chanh, ca cao, chè, chuối, bơ, sung, ổi, xoài, ô liu, đu đủ, điều, mắc ca, hạnh nhân, yến mạch, rau, cây cảnh, và cây lá kim.

Cây rau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, cà chua, rau diếp, đậu xanh, đậu lima, đậu Hà Lan, và cây thuộc giống *Curcumis* như dưa chuột, dưa vàng, và dưa lưới. Cây cảnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hoa đỗ quyên, tú cầu, hoa dâm bụt, hoa hồng, hoa tu-líp, thủy tiên hoa vàng, dã yên thảo, cẩm chướng, trạng nguyên, và hoa cúc. Tốt hơn là, cây theo sáng chế là cây trồng (ví dụ, ngô, lúa miến, lúa mì, hướng dương, cà chua, cây họ cải, hạt tiêu, khoai tây, bông, lúa, đậu nành, củ cải đường, mía đường, thuốc lá, lúa mạch, cây hạt cải dầu., v.v.).

Sử dụng trong kiểm soát loài gây hại

Phương pháp thông thường sử dụng các chủng chứa trình tự nucleotit theo sáng chế, biến thể của chúng, trong kiểm soát loài gây hại hoặc trong kỹ thuật lai các cơ quan khác làm tác nhân diệt loài gây hại là đã biết trong lĩnh vực. Tham khảo, ví dụ Sáng chế Mỹ số 5,039,523 và EP 0480762A2.

Chủng *Bacillus* chứa trình tự nucleotit theo sáng chế, hoặc biến thể của chúng, hoặc vi cơ quan mà được biến đổi gen để chứa gen diệt loài gây hại theo sáng chế và protein có thể được sử dụng để bảo vệ cây và sản phẩm nông nghiệp khỏi loài gây hại. Theo một khía cạnh của sáng chế, toàn bộ, cụ thể là, các tế bào của cơ quan tạo ra độc tố (chất diệt loài gây hại), không dung giải, được xử lý bằng chất phản ứng mà kéo dài hoạt

tính của độc tố tạo ra trong tế bào khi tế bào được áp dụng cho môi trường của (các) loài gây hại đích.

Tùy ý, chất diệt loài gây hại được tạo ra bằng cách đưa gen diệt loài gây hại vào vật chủ tế bào. Biểu hiện của gen diệt loài gây hại tạo ra, một cách trực tiếp hoặc gián tiếp, sự sản xuất nội bào và duy trì chất diệt loài gây hại. Theo một khía cạnh của sáng chế, các tế bào này sau đó được xử lý dưới các điều kiện mà kéo dài hoạt tính của độc tố được tạo ra trong tế bào khi tế bào được áp dụng cho môi trường của (các) loài gây hại đích. Sản phẩm thu được sở hữu tính độc của độc tố. Chất diệt loài gây hại kết nang tự nhiên sau đó có thể được phối chế theo kỹ thuật thông thường để áp dụng cho môi trường chứa loài gây hại đích, ví dụ, đất, nước, và bộ lá của cây. Tham khảo, ví dụ EPA 0192319, và các tài liệu tham khảo được viện dẫn trong đó. Tùy ý, có thể phối chế các tế bào biểu hiện gen theo sáng chế này để cho phép áp dụng vật liệu tạo thành làm chất diệt loài gây hại.

Các thành phần hoạt tính theo sáng chế thường được áp dụng dưới dạng chế phẩm và có thể được áp dụng lên khu vực cây trồng hoặc cây được xử lý, đồng thời hoặc, lần lượt, với các hợp chất khác. Các hợp chất này có thể là phân bón, chất diệt cỏ, tá được đông khô, chất hoạt động bề mặt, chất tẩy, xà phòng diệt loài gây hại, dầu không hoạt động, polyme, và/hoặc các chế phẩm chất mang kéo dài thời gian hoặc biến thoái sinh học mà cho phép liều dùng dài hạn cho vùng đích cho phép áp dụng đơn của chế phẩm. Chúng còn có thể là chất diệt cỏ chọn lọc, chất diệt côn trùng hóa học, chất diệt vi rút, chất diệt vi trùng, chất diệt amip, chất diệt loài gây hại, chất diệt nấm, chất diệt vi khuẩn, chất diệt giun tròn, chất diệt loài gây hại thân mềm hoặc hỗn hợp của các chế phẩm này, nếu muốn, cùng với các chất mang nông dụng khác, chất hoạt động bề mặt hoặc tá được thúc đẩy áp dụng thường được sử dụng trong lĩnh vực của chế phẩm. Chất mang và tá được thích hợp có thể là rắn hoặc lỏng và tương ứng với chất thường dùng trong công nghệ chế phẩm, ví dụ chất khoáng tái tạo hoặc tự nhiên, dung môi, chất phân rã, chất thấm ướt, chất dính, chất liên kết hoặc phân bón. Tương tự chế phẩm có thể được điều chế thành “mồi” ăn được hoặc được tạo hình thành “bẫy” diệt loài gây hại cho phép loài gây hại phá hoại hoặc ăn vào bụng chế phẩm diệt loài gây hại.

Các phương pháp áp dụng thành phần hoạt tính theo sáng chế hoặc chế phẩm nông hóa theo sáng chế mà chứa ít nhất một protein diệt loài gây hại tạo ra bởi chủng vi khuẩn

theo sáng chế bao gồm áp dụng cho lá, bao hạt và áp dụng cho đất. Số lượng áp dụng và tỷ lệ áp dụng phụ thuộc vào mật độ phá hoại bởi loài gây hại tương ứng.

Chế phẩm có thể được phối chế thành bột, bụi, viên đạn, hạt, bụi phun, nhũ tương, chất keo, dung dịch, hoặc dạng tương tự, và có thể được điều chế bằng các phương pháp thông thường như sấy khô, làm khô lạnh, đông nhất, chiết, lọc, ly tâm, sa lắng, hoặc cô đặc môi trường nuôi cấy tế bào chứa polypeptit. Trong tất cả các chế phẩm này mà chứa ít nhất một polypeptit diệt loài gây hại này, polypeptit có thể có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1% đến 99% theo khối lượng.

Loài gây hại cánh nửa có thể bị diệt hoặc giảm về số lượng trong vùng đưa ra bởi các phương pháp theo sáng chế, hoặc có thể được áp dụng phòng bệnh lên vùng môi trường để phòng ngừa sự phá hoại bởi loài gây hại dễ tấn công. Tốt hơn là loài gây hại ăn vào, hoặc tiếp xúc với, lượng có hiệu quả diệt loài gây hại của polypeptit. Thuật ngữ “lượng có hiệu quả diệt loài gây hại” để chỉ lượng chất diệt loài gây hại mà có khả năng gây ra cái chết cho ít nhất một loài gây hại, hoặc làm giảm đáng kể sự sinh trưởng, phá hoại, hoặc sự phát triển sinh lý bình thường của loài gây hại. Lượng này sẽ thay đổi phụ thuộc vào các tác nhân như, ví dụ, loài gây hại đích cụ thể được kiểm soát, môi trường cụ thể, địa điểm, cây, mùa, hoặc vị trí nông nghiệp được xử lý, các điều kiện môi trường, và phương pháp, tỷ lệ, nồng độ, sự ổn định, và số lượng áp dụng chế phẩm polypeptit có hiệu quả diệt loài gây hại. Các chế phẩm còn có thể thay đổi theo điều kiện thời tiết, sự cân nhắc môi trường, và/hoặc tần suất áp dụng và/hoặc mức độ trầm trọng của phá hoại do loài gây hại.

Chế phẩm chất diệt loài gây hại được mô tả có thể được thực hiện bằng cách phối chế hoặc là tế bào vi khuẩn, tinh thể và/hoặc huyền phù bào tử, hoặc thành phần protein phân lập với chất mang nông dụng mong muốn. Các chế phẩm có thể được phối chế trước khi cho dùng theo cách thích hợp như làm khô lạnh, đông khô, sấy khô, hoặc trong chất mang nước, môi trường hoặc chất pha loãng thích hợp, như nước muối hoặc chất đệm khác. Các chế phẩm phối chế có thể ở dạng vật liệu bụi hoặc hạt, hoặc huyền phù trong dầu (thực vật hoặc khoáng), hoặc nước hoặc nhũ tương dầu/nước, hoặc là bột thấm ướt được, hoặc kết hợp với bất kỳ vật liệu mang thích hợp cho áp dụng nông nghiệp. Chất mang nông nghiệp thích hợp có thể là rắn hoặc lỏng và đã biết trong lĩnh vực. Thuật ngữ “chất mang nông dụng” bao gồm toàn bộ tá dược, thành phần trợ, chất phân rã, chất hoạt động bề mặt, chất dính, chất liên kết v.v. mà thường dùng trong công nghệ chất diệt

loài gây hại; chúng là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực chế phẩm diệt loài gây hại. Các chế phẩm có thể được trộn với một hoặc nhiều tá được rắn hoặc lỏng và được điều chế bởi nhiều cách khác nhau, ví dụ, bằng cách trộn đồng nhất, trộn và/hoặc nghiền chế phẩm diệt loài gây hại với tá được thích hợp sử dụng các kỹ thuật phối chế thông thường. Các chế phẩm thích hợp và phương pháp áp dụng được mô tả trong Sáng chế Mỹ số 6,468,523, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Loài gây hại cánh nửa, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *Lygus* spp., như Rệp cây phương tây (*Lygus hesperus*), rệp cây (*Lygus lineolaris*), và rệp xanh hại cây (*Lygus elisus*); rệp vùng, như rầy xanh hại đào (*Myzus persicae*), rầy mềm hại bông (*Aphis gossypii*), rầy hại anh đào hoặc rầy đen hại anh đào (*Myzus cerasi*), rầy hại đậu nành (*Aphis glyxins* Matsumura); rầy nâu (*Nilaparvata lugens*), rầy xanh hại lá lúa (*Nephotettix* spp.), rầy lưng trắng (*Sogatella furcifera*) và rầy nâu nhỏ (*Laodelphax striatellus*); và bọ xít, như bọ xít xanh (*Acrosternum hilare*), bọ xít nâu (*Halyomorpha halys*), bọ xít xanh phương tây (*Nezara viridula*), bọ xít hại lúa (*Oebalus pugnax*), bọ xít rừng (*Pentatoma rufipes*), Bọ xít châu âu (*Rhaphigaster nebulosa*), và bọ cánh hình khiên *Troilus luridus*. Theo một số phương án, loài gây hại cánh nửa là rầy gây hại, như rầy nâu.

Phương pháp làm tăng sản lượng cây

Phương pháp làm tăng sản lượng cây được đề xuất. Phương pháp bao gồm việc cho cắt hoặc tế bào của cây biểu hiện polynucleotit mã hóa trình tự polypeptit diệt loài gây hại được bộc lộ ở đây và trồng cây hoặc hạt của chúng trên cánh đồng bị phá hoại bởi (hoặc dễ bị phá hoại bởi) loài gây hại mà polypeptit này có hoạt tính diệt loài gây hại. Theo một số phương án, polypeptit Axmi011 được mô tả ở đây có hoạt tính diệt loài gây hại chống loài gây hại cánh nửa, và cánh đồng này bị phá hoại bởi loài gây hại cánh nửa này. Theo nhiều phương án khác nhau, loài gây hại cánh nửa là rầy gây hại, như rầy nâu (*Nilaparvata lugens*). Như được xác định ở đây, “sản lượng” của cây đề cập đến chất lượng và/hoặc số lượng sinh khối tạo ra bởi cây. Thuật ngữ “sinh khối” để chỉ sản phẩm của cây được đo bất kỳ. Tăng sản lượng sinh khối là sự cải thiện bất kỳ về sản lượng của sản phẩm cây được đo. Việc tăng sản lượng cây có một số ứng dụng kinh tế. Ví dụ, tăng sinh khối lá cây có thể làm tăng sản lượng của rau ăn lá cho tiêu dùng của người hoặc động vật. Ngoài ra, tăng sinh khối lá có thể được sử dụng để làm tăng sản lượng của các

sản phẩm được hoặc công nghiệp chiết xuất từ lá. Tăng sản lượng có thể bao gồm việc tăng bất kỳ đáng kể về mặt thống kê bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tăng ít nhất 1%, tăng ít nhất 3%, tăng ít nhất 5%, tăng ít nhất 10%, tăng ít nhất 20%, tăng ít nhất 30%, ít nhất 50%, ít nhất 70%, ít nhất 100% hoặc nhiều hơn về sản lượng so với cây không biểu hiện trình tự diệt loài gây hại. Theo các phương án cụ thể, sản lượng của cây được tăng do khả năng kháng loài gây hại cải thiện ở cây biểu hiện protein diệt loài gây hại được bộc lộ ở đây. Biểu hiện của protein diệt loài gây hại tạo ra việc giảm khả năng bị loài gây hại phá hoại hoặc ăn.

Cây còn có thể được xử lý bằng một hoặc nhiều chế phẩm hóa học, bao gồm một hoặc nhiều chất diệt cỏ, chất diệt côn trùng, hoặc chất diệt nấm. Các chế phẩm hóa học ví dụ bao gồm: Chất diệt cỏ cho cây ăn quả/rau: Atrazin, Bromaxil, Diuron, Glyphosat, Linuron, Metribuzin, Simazin, Trifluralin, Fluazifop, Glufosinat, Halosulfuron Gowan, Paraquat, Propyzamide, Setoxydim, Butafenacil, Halosulfuron, Indaziflam; Chất diệt côn trùng cho cây ăn quả/rau: Aldicarb, Bacillus thuriangiensis, Carbaryl, Carbofuran, Chlorpyrifos, Xypermethrin, Deltamethrin, Abamectin, Xyfluthrin/beta-xyfluthrin, Ecfenvalerat, Lambda-xyhalothrin, Axiqunoxyl, Bifenazat, Metoxyfenozit, Novaluron, Chromafenozit, Thiacloprid, Dinotefuran, Fluacrypyrim, Spirodiclofen, Gamma-xyhalothrin, Spiromesifen, Spinosad, Rynaxypyr, Xyazypyr, Triflumuron, Spirotetramat, Imidacloprid, Flubendiamit, Thiodicarb, Metaflumizon, Sulfoxaflor, Xyflumetofen, Xyanopyrafen, Clothianidin, Thiametoxam, Spinotoram, Thiodicarb, Flonicamid, Methiocarb, Eamectin-benzoat, Indoxacarb, Fenamiphos, Pyriproxifen, Fenbutatin-oxit; Chất diệt nấm cho cây ăn quả/rau: Ametoctradin, Azoxystrobin, Benthiavalicarb, Boscalid, Captan, Carbendazim, Chlorothalonil, Đòng, Xyazofamid, Xyflufenamid, Xymoxanil, Xyproconazol, Xyprodinil, Difenconazol, Dimetomorph, Dithianon, Fenamidon, Fenhexamid, Fluazinam, Fludioxonil, Fluopicolit, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluxapyroxad, Folpet, Fosetyl, Iprodion, Iprovalicarb, Isopyrazam, Kresoxim-metyl, Mancozeb, Mandipropamid, Metalaxyl/mefenoxam, Metiram, Metrafenon, Myclobutanil, Penconazol, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propamocarb, Propiconazol, Propineb, Proquinazid, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Pyrimethanil, Quinoxifen, Spiroxamin, Lru huỳnh, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Chất diệt cỏ cho ngũ cốc: 2,4-D, Amidosulfuron, Bromoxynil, Carfentrazon-E, Chlorotoluron, Chlorsulfuron, Clodinafop-P, Clopyralid, Dicamba, Diclofop-M, Diflufenican, Fenoxaprop, Florasulam,

Flucarbazon-NA, Flufenaxet, Flupyrosulfuron-M, Fluroxypyr, Flurtamon, Glyphosat, Iodosulfuron, Ioxynil, Isoproturon, MCPA, Mesosulfuron, Metsulfuron, Pendimethalin, Pinoxaden, Propoxycarbazon, Prosulfocarb, Pyroxsulam, Sulfosulfuron, Thifensulfuron, Tralkoxydim, Triasulfuron, Tribenuron, Trifluralin, Tritosulfuron; Chất diệt nấm cho ngũ cốc: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Chlorothalonil, Xyflufenamid, Xyproconazol, Xyprodinil, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fenpropidin, Fenpropimorph, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluquinconazol, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Kresoxim-metyl, Metconazol, Metrafenon, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Prochloraz, Propiconazol, Proquinazid, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Quinoxifen, Spiroxamin, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Chất diệt côn trùng cho ngũ cốc: Dimethoat, Lambda-cyhalothrin, Deltamethrin, alpha-Xypermethrin, beta-xyfluthrin, Bifenthrin, Imidacloprid, Clothianidin, Thiametoxam, Thiacloprid, Axetamiprid, Dinetofuran, Clorphyriphos, Pirimicarb, Methiocarb, Sulfoxaflor; Chất diệt cỏ cho ngô: Atrazin, Alachlor, Bromoxynil, Axetochlor, Dicamba, Clopyralid, (S-)Dimethenamid, Glufosinat, Glyphosat, Isoxaflutol, (S-)Metolachlor, Mesotrion, Nicosulfuron, Primisulfuron, Rimsulfuron, Sulcotrion, Foramsulfuron, Topramezone, Tembotrione, Saflufenacil, Thiencarbazon, Flufenaxet, Pyroxasulfon; Chất diệt côn trùng cho ngô: Carbofuran, Chlorpyrifos, Bifenthrin, Fipronil, Imidacloprid, Lambda-Xyhalothrin, Tefluthrin, Terbufos, Thiametoxam, Clothianidin, Spiromesifen, Flubendiamit, Triflumuron, Rynaxypyr, Deltamethrin, Thiodicarb, beta-Xyfluthrin, Xypermethrin, Bifenthrin, Lufenuron, Tebupirimphos, Ethiprol, Xyazypyr, Thiacloprid, Axetamiprid, Dinetofuran, Avermectin; Chất diệt nấm cho ngô: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Xyproconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fenitropan, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Metconazol, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propiconazol, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Trifloxystrobin; Chất diệt cỏ cho lúa: Butachlor, Propanil, Azimsulfuron, Bensulfuron, Xyhalofop, Daimuron, Fentrazamit, Imazosulfuron, Mefenaxet, Oxaziclomefon, Pyrazosulfuron, Pyributicarb, Quinclorac, Thiobencarb, Indanofan, Flufenaxet, Fentrazamit, Halosulfuron, Oxaziclomefon, Benzobixyclon, Pyriftalid, Penoxsulam, Bispyribac, Oxadiargyl, Etoxysulfuron, Pretilachlor, Mesotrion, Tefuryltrion, Oxadiazon, Fenoxaprop, Pyrimisulfan; Chất diệt côn trùng cho lúa: Diazinon, Fenobucarb, Benfuracarb, Buprofezin, Dinotefuran, Fipronil, Imidacloprid, Isoprocarb, Thiacloprid, Chromafenozit, Clothianidin, Ethiprol, Flubendiamit,

Rynaxypyr, Deltamethrin, Axetamiprid, Thiametoxam, Xyazypyr, Spinosad, Spinotoram, Eamectin-Benzoat, Xypermethrin, Chlorpyrifos, Etofenprox, Carbofuran, Benfuracarb, Sulfoxaflor; Chất diệt nấm cho lúa: Azoxystrobin, Carbendazim, Carpropamid, Dicloxymet, Difenconazol, Edifenphos, Ferimzon, Gentamycin, Hexaconazol, Hymexazol, Iprobenfos (IBP), Isoprothiolan, Isotianil, Kasugamycin, Mancozeb, Metominostrobin, Orysastrobin, Pencycuron, Probenazol, Propiconazol, Propineb, Pyroquilon, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Tiadinil, Trioxyclozol, Trifloxystrobin, Validamycin; Chất diệt cỏ cho bông: Diuron, Fluometuron, MSMA, Oxyfluorfen, Prometryn, Trifluralin, Carfentrazone, Clethodim, Fluazifop-butyl, Glyphosat, Norflurazon, Pendimethalin, Pyriproxyfen, Trifloxysulfuron, Tepraloxydim, Glufosinat, Flumioxazin, Thidiazuron; Chất diệt côn trùng cho bông: Axephat, Aldicarb, Chlorpyrifos, Xypermethrin, Deltamethrin, Abamectin, Axetamiprid, Eamectin Benzoat, Imidacloprid, Indoxacarb, Lambda-Xyhalothrin, Spinosad, Thiodicarb, Gamma-Xyhalothrin, Spiromesifen, Pyridalyl, Flonicamid Flubendiamit, Triflumuron, Rynaxypyr, Beta-Xyfluthrin, Spirotetramat, Clothianidin, Thiametoxam, Thiacloprid, Dinotofuran, Flubendiamit, Xyazypyr, Spinosad, Spinotoram, gamma Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)methyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on, Thiodicarb, Avermectin, Flonicamid, Pyridalyl, Spiromesifen, Sulfoxaflor; Chất diệt nấm cho bông: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Chlorothalonil, Đồng, Xyproconazol, Difenconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fenamidon, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Fluxapyroxad, Iprodion, Isopyrazam, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metominostrobin, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propineb, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Quintozen, Tebuconazol, Tetraconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Chất diệt cỏ cho đậu nành: Alachlor, Bentazon, Trifluralin, Chlorimuron-Etyl, Cloransulam-Metyl, Fenoxaprop, Fomesafen, Fluazifop, Glyphosat, Imazamox, Imazaquin, Imazethapyr, (S-)Metolachlor, Metribuzin, Pendimethalin, Tepraloxydim, Glufosinat; Chất diệt côn trùng cho đậu nành: Lambda-xyhalothrin, Metomyl, Imidacloprid, Clothianidin, Thiametoxam, Thiacloprid, Axetamiprid, Dinotofuran, Flubendiamit, Rynaxypyr, Xyazypyr, Spinosad, Spinotoram, Eamectin-Benzoat, Fipronil, Ethiprol, Deltamethrin, β -Xyfluthrin, gamma và lambda Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)methyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on, Spirotetramat, Spinodiclofen, Triflumuron, Flonicamid, Thiodicarb, beta-Xyfluthrin; Chất diệt nấm cho

đầu nành: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Chlorothalonil, Đồng, Xyproconazol, Difenconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Flutriafol, Fluxapyroxad, Isopyrazam, Iprodion, Isotianil, Mancozeb, Maneb, Metconazol, Metominostrobin, Myclobutanil, Penthiopyrad, Picoxystrobin, Propiconazol, Propineb, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Tetraconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin; Chất diệt cỏ cho củ cải đường: Chloridazon, Desmedipham, Ethofumesat, Phenmedipham, Trialat, Clopyralid, Fluazifop, Lenaxil, Metamideron, Quinmerac, Xycloxydim, Triflurosulfuron, Tepraloxym, Quizalofop; Chất diệt côn trùng cho củ cải đường: Imidacloprid, Clothianidin, Thiametoxam, Thiacloprid, Axetamiprid, Dinotofuran, Deltamethrin, β -Xyfluthrin, gamma/lambda Xyhalothrin, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)metyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on, Tefluthrin, Rynaxypyr, Xyaxypyr, Fipronil, Carbofuran; Chất diệt cỏ cho cải dầu: Clopyralid, Diclofop, Fluazifop, Glufosinat, Glyphosat, Metazachlor, Trifluralin Ethametsulfuron, Quinmerac, Quizalofop, Clethodim, Tepraloxym; Chất diệt nấm cho cải dầu: Azoxystrobin, Bixafen, Boscalid, Carbendazim, Xyproconazol, Difenconazol, Dimoxystrobin, Epoxiconazol, Fluazinam, Fluopyram, Fluoxastrobin, Flusilazol, Fluxapyroxad, Iprodion, Isopyrazam, Mepiquat-clorua, Metconazol, Metominostrobin, Paclobutrazol, Penthiopyrad., Picoxystrobin, Prochloraz, Prothioconazol, Pyraclostrobin, Tebuconazol, Thiophanat-metyl, Trifloxystrobin, Vinclozolin; Chất diệt côn trùng cho cải dầu: Carbofuran, Thiacloprid, Deltamethrin, Imidacloprid, Clothianidin, Thiametoxam, Axetamiprid, Dinotofuran, β -Xyfluthrin, gamma và lambda Xyhalothrin, tau-Fluvaleriat, Ethiprol, Spinosad, Spinotoram, Flubendiamit, Rynaxypyr, Xyazypyr, 4-[[[(6-Chlorpyridin-3-yl)metyl](2,2-difluoretyl)amino]furan-2(5H)-on.

Các ví dụ sau đây được đưa ra để minh họa và không nhằm giới hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Biểu hiện và hoạt tính của Axmi011

Gen Axmi011 (SEQ ID NO:1) được phân lập từ chủng *Bacillus thuringiensis* mà thu được từ Bộ sưu tập nuôi cấy ARS Collection của Bộ nông nghiệp Hoa Kỳ, và được mô tả trong Công bố đơn Sáng chế Mỹ 20080070829. Trình tự axit amin AXMI011 (SEQ ID NO:3) có 23% tương đồng trình tự với Mtx2.

Axm011 chiều dài đầy đủ, cũng như phiên bản cắt cụt của Axmi011 trong đó trình tự nucleotit mã hóa trình tự tín hiệu giả định được loại và được thay thế bằng mã đầu tận cùng N mã hóa methionin, được biểu hiện và được thử hoạt tính sinh học. Trình tự axit amin cho protein Axmi011 cắt cụt được nêu ở SEQ ID NO:4. Gen là PCR được khuếch đại bằng cách sử dụng Herculase polymeraza với các đoạn mồi kết hợp đoạn nối NotI trên đầu 5' và đoạn nối AscI ở đầu 3'. Sản phẩm PCR được khuếch đại tự hoại bằng AscI và NotI và được thất vào vector pMalC4X để tạo ra plasmid pAX7606. Dòng tế bào được xác nhận bằng cách tạo trình tự và pAX7606 được biến đổi vào tế bào khả nạp B121. Cụm tế bào đơn của mỗi dòng tế bào được cấy trong môi trường LB và được nuôi lớn ở 37°C đến pha log, và được cảm sinh bằng 1,0 mM IPTG ở 16 °C trong 16 giờ. Axmi011 tinh chế và Axmi011 cắt cụt được bổ sung vào thử nghiệm sinh học với các loài gây hại côn trùng được chọn theo phương pháp tiêu chuẩn. Còi cọc nặng và hơn 75% tỷ lệ chết được chỉ ra đối với *Nilaparvata lugens* (BPH) sử dụng cả Axmi011 và Axmi011 cắt cụt.

Ví dụ 2. Vector hóa gen để biểu hiện ở cây

Vùng mã hóa theo sáng chế được nối với gen khởi động thích hợp và trình tự kết thúc để biểu hiện ở cây. Trình tự này là đã biết trong lĩnh vực. Các kỹ thuật để tạo ra và xác nhận cấu trúc gen khởi động – gen – gen kết thúc cũng là đã biết trong lĩnh vực.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trình tự ADN nhân tạo được thiết kế và được tạo ra. Các trình tự nhân tạo này được thay thế trình tự nucleotit so với trình tự của bố mẹ, nhưng mã hóa protein mà cơ bản tương đồng với trình tự của bố mẹ. Theo một số phương án, trình tự ADN nhân tạo chứa SEQ ID NO:2.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, các phiên bản cải biến của gen nhân tạo được thiết kế sao cho peptit thu được nhắm đến cơ quan tế bào của cây, như lưới nội bào hoặc không bào. Các trình tự peptit được biết là tạo ra sự nhắm đích của protein dung hợp đến cơ quan tế bào của cây là đã biết trong lĩnh vực. Ví dụ, vùng đầu tận cùng N của gen axit phosphatase từ White Lupin *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller và cộng sự (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) là đã biết trong lĩnh vực để tạo ra trong lưới nội bào sự nhắm đích của các protein khác loại. Nếu protein dung hợp tạo thành cũng chứa trình tự lưu giữ của lưới nội bào chứa peptit đầu tận cùng N-lysin-aspartic axit-glutamic axit-leuxin (cụ thể là, mô típ “KDEL”, SEQ ID NO:5) ở đầu tận cùng C, protein dung hợp sẽ được nhắm đến lưới nội bào. Nếu protein dung hợp thiếu trình tự

nhắm đích lưới nội bào ở đầu tận cùng C, protein sẽ nhắm đích đến lưới nội bào, nhưng cuối cùng sẽ bị cô lập trong không bào.

Do đó, gen mã hóa protein dung hợp mà chứa axit amin ba mươi một đầu tận cùng N của gen axit phosphatase từ White Lupin *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller và cộng sự, 2001, ở trên) được dung hợp vào đầu tận cùng N của trình tự axit amin theo sáng chế, cũng như trình tự KDEL (SEQ ID NO:5) ở đầu tận cùng C. Do đó, protein thu được được dự báo là được nhắm đích lưới nội bào của cây khi biểu hiện ở tế bào cây.

Cat-xet biểu hiện của cây được mô tả ở trên được kết hợp với chất đánh dấu chọn lọc của cây thích hợp để giúp trong việc chọn lọc các tế bào và mô biến đổi, và được chèn vào vector biến đổi của cây. Chúng có thể bao gồm vector hai kỳ từ biến đổi trung gian bởi *Agrobacterium* hoặc vector plasmid đơn để biến đổi sol khí hoặc bắn gen.

Theo sáng chế, cat-xet biểu hiện gồm gen nhân tạo mã hóa Axmi011 (SEQ ID NO:2) liên kết hoạt động với vùng gen khởi động của gen sucroza synthase 1 của *Oryza sativa* (Wang và cộng sự (1992) *Plant Molecular Biology*, 19, 881-885) hoặc vùng gen khởi động của Cauliflower Mosaic Virus 35S transcript (Odell và cộng sự (1985) *Nature* 313, 810-812) và trình tự dẫn của gen chất diệt lục a/b liên kết protein của *Petunia hybrid* (Harpster và cộng sự (1988) *Molecular and General Genetics* 212, 182-190). Các cat-xet biểu hiện còn chứa vùng không dịch mã 3' của gen nopaline synthase từ T-ADN của pTiT37 (Depicker và cộng sự (1982) *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1, 561-573) liên kết hoạt động với đầu 3' của trình tự Axmi011.

Ví dụ 4. Biến đổi gen ở lúa

Hạt lúa non, chứa phôi ở giai đoạn phát triển đúng, được thu từ cây cho được trồng dưới các điều kiện kiểm soát tốt trong nhà kính. Sau khi khử trùng hạt, phôi non được cắt mô và cấy sinh trước trong môi trường rắn trong 3 ngày. Sau khi cấy sinh trước, phôi được ngâm vài phút trong huyền phù *Agrobacterium* tạo ra vector mong muốn. Sau đó phôi được đồng nuôi cấy trên môi trường rắn chứa acetosyringon và được ủ trong bóng tối trong 4 ngày. Mô cấy sau đó được chuyển sang môi trường chọn lọc đầu tiên chứa phosphotrioxin làm chất chọn lọc. Sau gần 3 tuần, vảy có vết sần phát triển được cắt thành các mảnh nhỏ hơn và được chuyển vào môi trường chọn lọc tương tự. Nuôi cấy phụ tiếp theo được thực hiện khoảng mỗi 2 tuần. Trong mỗi nuôi cấy phụ, calli

phát triển hoạt tính được cắt thành các mảnh nhỏ hơn và được ủ trên môi trường chọn lọc thứ hai. Sau vài tuần calli rõ ràng kháng phosphinotrixin được chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc. Cây con tạo ra được nuôi cấy trên nửa MS mạnh cho dài hết cỡ. Cuối cùng cây được chuyển sang đất và được nuôi lớn trong nhà kính.

Toàn bộ các công bố và đơn sáng chế được đề cập trong bản mô tả là ở mức độ chuyên gia trong lĩnh vực mà sáng chế đề cập. Toàn bộ các công bố và đơn sáng chế được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến mức độ nào đó như là riêng từng công bố hoặc đơn sáng chế được chỉ ra cụ thể hoặc riêng biệt là được kết hợp bằng cách viện dẫn.

Mặc dù sáng chế nêu trên được mô tả khá cụ thể bằng cách minh họa và các ví dụ để hiểu rõ, nhưng rõ ràng là các thay đổi và cải biến nhất định có thể được thực hiện trong phạm vi các điểm yêu cầu bảo hộ đi kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kiểm soát quần thể loài gây hại cánh nửa bao gồm việc cho quần thể này tiếp xúc với lượng có hiệu quả diệt loài gây hại của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 4.
2. Phương pháp kiểm soát quần thể rầy gây hại bao gồm việc cho quần thể này tiếp xúc với lượng có hiệu quả diệt loài gây hại của polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 4.
3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó rầy gây hại này là rầy nâu, và cây là cây lúa.
4. Phương pháp bảo vệ cây khỏi loài gây hại cánh nửa, bao gồm việc biểu hiện ở cây hoặc tế bào của nó trình tự nucleotit liên kết hoạt động với gen khởi động có khả năng định hướng biểu hiện của trình tự nucleotit ở tế bào cây, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO: 2; và
 - b) trình tự nucleotit mà mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 4.
5. Phương pháp làm tăng sản lượng ở cây bao gồm việc trồng trên cánh đồng cây hoặc hạt của nó đã kết hợp ổn định vào bộ gen của nó cấu trúc ADN chứa trình tự nucleotit liên kết hoạt động với gen khởi động có khả năng định hướng biểu hiện của trình tự nucleotit ở tế bào cây, trong đó trình tự nucleotit này được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO: 2; và
 - b) trình tự nucleotit mà mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO: 4;
 trong đó cánh đồng bị phá hoại bởi loài gây hại cánh nửa.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó loài gây hại là rầy nâu gây hại, và trong đó cây là cây lúa.
7. Phương pháp theo các điểm 4-6, trong đó cây còn chứa một hoặc nhiều trình tự nucleotit mã hóa một hoặc nhiều độc tố diệt côn trùng bổ sung.

8. Cây hoặc tế bào cây chứa trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:2, trong đó trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO. 4.
9. Cat-xet biểu hiện chứa trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:2, trong đó trình tự nucleotit mã hóa polypeptit bao gồm trình tự axit amin nêu ở SEQ ID NO. 4.
10. Axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit nêu ở SEQ ID NO:2.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Sampson, Kimberly
 Lehtinen, Duane
 van Vliet, Adri
 van Rie, Jeroen
 Portz, Daniela

<120> Phương pháp kiểm soát quần thể loài gây hại cánh nửa và quần thể rầy gây hại, phương pháp bảo vệ cây khỏi loài gây hại cánh nửa và phương pháp làm tăng sản lượng ở cây

<130> APA13-6053

<160> 5

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 957

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

atgaataaaa aacctatggt agcgttgata ttagccactt cgattggtat accttgtaca	60
tttacacctg gaagtgcatt agcagcagaa aatattcaga ctagtggtta tgaaaatgta	120
aaagttggta ttacagatgt tcaatctgaa ttgaataaga taggagacta ttattatagt	180
aataaacttag caaatagcag tataaaacct cctcatcatt gggattatac acttaaaaaa	240
aatcctgata aagttggaac aaatttggat tttagtatta ctggtactgc tagtaaaacta	300
aattatgata gtgtaactcc tatatacatt gggcataatg aatttaataa tgattcagat	360
cagcctcaaa aattttacaac ttctaaattt actaaagctg taacagaggg aacaacaagt	420
accgtaacaa atggattttag attaggaaat ccaggtttta acttatttac tattccatta	480
attttaagtg atggtatgaa aattaatgcg gaatttaact cttctacttc agaactctcaa	540
caaaaatcgg aaacaaaaac aatagaagca tcacctcaaa acatagaagt tccagcacat	600
aaaaaatata aagtagatgt tgtattggaa caacaagct attgggcaga tgttacattt	660
acaggtgaag gaattaatct taatactact ataaatgcaa ctggaataca tactgggcat	720
atgggaatgc aggagtcaag aaaattttct tggaacaaaa ataccattga attatttaat	780
ggactaaaac aagagcaaaa aaataatata catgggatta aatttagtaa tgggaaaatg	840
aatgcaaacg gaacaggtaa agttgaaggt attttttgga gtaatctagt tgtaaaggta	900
aatgatgtta cagatccatt aaatcctatc ctagtaatga ctaaaagttt aaaataa	957

<210> 2
 <211> 876
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> gen tổng hợp mã hóa Axmi011

<400> 2
 atggcggaga acatccagac ctccgtcaat gaaaatgtta aggtgggcat cacagatgtg 60
 cagagcgcagc tgaacaagat cggagattat tattattcaa acaacctggc caacaccacc 120
 atcaagccgc cgcaccactg ggactacacc ctcaagaaga acccggacaa ggtgggcacc 180
 aacctggact tctccatcac cggcaccgcc agcaagctga actatgacag cgtcaccccc 240
 atctacatcg gccacaacga gttcaacaat gattcagacc agccgcagaa gttcaccacc 300
 agcaagttca ccaaggccgt cacagaaggc accaccagca ccgtcaccaa tggcttccgg 360
 ctgggcaacc ccggcctcaa cctcttcacc atccccctca tcctctctga tggcatgaag 420
 atcaatgcag agttcaacag cagcacctca gagagtcagc agaagagcga gacaaagacc 480
 atcgaggcct cgccgcagaa catcgagggt ccggcgcaca agaagtacaa ggtggatgtg 540
 gtgctggagc agaccagcta ctgggctgat gtcaccttca ccggcgaggg catcaacctg 600
 aacaccacca tcaacgccac cggcatccac accggccaca tgggcatgca agaataaagg 660
 aagttcagct ggaacaagaa caccattgag ctcttcaacg gcctcaagca ggagcagaag 720
 aacaacattc atggcatcaa gttcagcaac ggcaagatga acgccaatgg caccggcaag 780
 gtggagggca tcttcggcag caacctggtg gtgaagggtga atgatgtcac agatcccctc 840
 aaccccatcc tggatgatgac caagagcctc aagtga 876

<210> 3
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 3

Met	Asn	Lys	Lys	Pro	Met	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Ala	Thr	Ser	Ile	Gly
1				5					10					15	
Ile	Pro	Cys	Thr	Phe	Thr	Pro	Gly	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Glu	Asn	Ile
			20					25					30		
Gln	Thr	Ser	Val	Asn	Glu	Asn	Val	Lys	Val	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Gln
		35					40					45			
Ser	Glu	Leu	Asn	Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ala
	50					55					60				

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

<210> 4

<211> 291

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phiên bản cắt cụt của Axmi011

<400> 4

```

Met Ala Glu Asn Ile Gln Thr Ser Val Asn Glu Asn Val Lys Val Gly
1           5           10           15
Ile Thr Asp Val Gln Ser Glu Leu Asn Lys Ile Gly Asp Tyr Tyr Tyr
          20           25           30
Ser Asn Asn Leu Ala Asn Thr Thr Ile Lys Pro Pro His His Trp Asp
          35           40           45
Tyr Thr Leu Lys Lys Asn Pro Asp Lys Val Gly Thr Asn Leu Asp Phe
          50           55           60
Ser Ile Thr Gly Thr Ala Ser Lys Leu Asn Tyr Asp Ser Val Thr Pro
65           70           75           80
Ile Tyr Ile Gly His Asn Glu Phe Asn Asn Asp Ser Asp Gln Pro Gln
          85           90           95
Lys Phe Thr Thr Ser Lys Phe Thr Lys Ala Val Thr Glu Gly Thr Thr
          100          105          110
Ser Thr Val Thr Asn Gly Phe Arg Leu Gly Asn Pro Gly Leu Asn Leu
          115          120          125
Phe Thr Ile Pro Leu Ile Leu Ser Asp Gly Met Lys Ile Asn Ala Glu
          130          135          140
Phe Asn Ser Ser Thr Ser Glu Ser Gln Gln Lys Ser Glu Thr Lys Thr
145          150          155          160
Ile Glu Ala Ser Pro Gln Asn Ile Glu Val Pro Ala His Lys Lys Tyr
          165          170          175
Lys Val Asp Val Val Leu Glu Gln Thr Ser Tyr Trp Ala Asp Val Thr
          180          185          190
Phe Thr Gly Glu Gly Ile Asn Leu Asn Thr Thr Ile Asn Ala Thr Gly
          195          200          205
Ile His Thr Gly His Met Gly Met Gln Glu Ser Arg Lys Phe Ser Trp
          210          215          220
Asn Lys Asn Thr Ile Glu Leu Phe Asn Gly Leu Lys Gln Glu Gln Lys
225          230          235          240
Asn Asn Ile His Gly Ile Lys Phe Ser Asn Gly Lys Met Asn Ala Asn
          245          250          255
Gly Thr Gly Lys Val Glu Gly Ile Phe Gly Ser Asn Leu Val Val Lys
          260          265          270
Val Asn Asp Val Thr Asp Pro Leu Asn Pro Ile Leu Val Met Thr Lys
          275          280          285
Ser Leu Lys
          290

```

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit nhắm đến lưới nội bào

<400> 5

Lys Asp Glu Leu

1