



(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)



1-0037154

(51)⁷ C12N 15/63; A01N 47/44; A01N 57/16; (13) B
C12N 15/84; C07K 14/32; C12N 15/31;
A01H 5/00; A01P 7/04

(21) 1-2016-02021

(22) 13/11/2014

(86) PCT/CN2014/091016 13/11/2014

(87) WO/2015/070778 21/05/2015

(30) 201310573441.6 15/11/2013 CN

(45) 25/10/2023 427

(43) 26/09/2016 342A

(73) 1. Beijing Dabeinong Technology Group Co., Ltd. (CN)

No. 14 Floor Zhongguancun Building, No. 27 Zhongguancun Street, Haidian District, Beijing 100080, China

2. Beijing Dabeinong Biotechnology Co., Ltd. (CN)

No. 2 Building Institute for Application of Atomic Energy, Institute of Plant Protection, No. 2 Yuanmingyuan West Road, Haidian District, Beijing 100193, China

(72) Yuejing KANG (CN); Dengyuan WANG (CN); Guowei JIAO (CN); Cong TIAN (CN); Yunzhu ZHANG (CN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyền (INVENCO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CÔN TRÙNG GÂY HẠI SPODOPTERA LITURA

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *spodoptera litura*, trong đó côn trùng gây hại *spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3A và côn trùng gây hại *spodoptera litura* được kiểm soát nhờ protein Vip3A được tổng hợp trong cây trồng và có khả năng diệt côn trùng *spodoptera litura*.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát côn trùng, cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* ở cây trồng bằng cách biểu hiện protein Vip3A ở cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Spodoptera litura thuộc họ bướm đêm, bộ cánh vảy. Côn trùng này là côn trùng ăn tạp và háu ăn và có hại với nhiều loại vật chủ. Ngoài cây ngô và cây đậu tương, côn trùng này cũng có thể gây hại với cây dưa, cây cà tím, cây đậu, cây họ tây, cây tỏi tây, rau bina cũng như là cây thuộc họ cải, hạt và các cây trồng kinh tế v.v. trong tổng số gần 100 họ và hơn 300 loài cây trồng. *Spodoptera litura* được phân bố trên toàn thế giới và xuất hiện ở nhiều nơi khác nhau của Trung Quốc, chủ yếu ở lưu vực sông Dương Tử và lưu vực sông Hoàng Hà. Côn trùng gây hại *Spodoptera litura* chủ yếu có hại với toàn cây khi chúng là ấu trùng và sống trên mặt sau lá thành nhóm và gặm lá khi chúng ở giai đoạn tuổi thấp. Sau tuổi ba, chúng sẽ phát tán và gây hại với lá và thân non. Ấu trùng trưởng thành có thể ăn vào quả.

Cây ngô và cây đậu tương là các cây lương thực quan trọng ở Trung Quốc. Hàng năm, một lượng lớn hạt bị tổn thất do *Spodoptera litura* gây ra. Trong các trường hợp nghiêm trọng hơn, côn trùng này có thể làm ảnh hưởng đến điều kiện sống của người dân. Để kiểm soát *Spodoptera litura*, người dân thường sử dụng phương pháp kiểm soát chủ yếu sau: phương pháp kiểm soát nông nghiệp, phương pháp kiểm soát hóa học và phương pháp kiểm soát vật lý.

Phương pháp kiểm soát nông nghiệp là sự quản lý và phối hợp toàn diện nhiều yếu tố của toàn bộ hệ sinh thái đất canh tác để điều chỉnh và kiểm soát các cây trồng, côn trùng và các yếu tố môi trường để tạo ra một môi trường sinh thái đất canh tác mà có lợi cho sự phát triển cây trồng nhưng không có lợi cho sự xuất hiện

của *Spodoptera litura*. Ví dụ, nhổ cỏ dại, quay vòng đất và phơi nắng sau khi thu hoạch hoặc tưới tiêu có thể tiêu diệt hoặc phá hủy các vị trí phát triển thành nhộng của *Spodoptera litura* nhờ vậy làm giảm các nguồn côn trùng; hoặc ví dụ, khối trứng và ấu trùng mới nở tạo cụm được loại bỏ bằng cách này trong quá trình kiểm soát để làm giảm nguồn côn trùng gây hại. Vì phương pháp kiểm soát nông nghiệp chủ yếu sử dụng các biện pháp phòng ngừa, nên việc áp dụng phương pháp này bị hạn chế và không được sử dụng làm biện pháp khẩn cấp. Trong trường hợp bùng phát *Spodoptera litura*, thì phương pháp này không có tác dụng.

Phương pháp kiểm soát hóa học, tức là kiểm soát bằng thuốc trừ sâu, sử dụng các thuốc trừ sâu hóa học để diệt côn trùng gây hại. Đây là một phần quan trọng của việc kiểm soát hoàn toàn *Spodoptera litura*. Phương pháp này được đặc trưng bởi tốc độ diệt nhanh, thuận tiện, dễ sử dụng và hiệu quả kinh tế cao, đặc biệt là khi bùng nổ *Spodoptera litura*, đây là biện pháp không thể thiếu trong trường hợp khẩn cấp. Phương pháp này có thể diệt *Spodoptera litura* trước khi nó gây hại. Hiện tại, phương pháp kiểm soát hóa học chủ yếu là phun thuốc. Tuy nhiên, phương pháp kiểm soát hóa học cũng có hạn chế. Nếu phương pháp này không được sử dụng thích hợp, thì nó có thể gây độc cho cây trồng, gây kháng thuốc ở côn trùng gây hại, cũng như là có thể làm giảm hoặc làm thương các thiên địch, gây ô nhiễm môi trường, mà có thể gây ra các hậu quả xấu như phá hủy hệ sinh thái đất canh tác và đe dọa sự an toàn của con người và vật nuôi do lượng dư thuốc trừ sâu.

Phương pháp kiểm soát vật lý là phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại bằng cách sử dụng các yếu tố vật lý như: ánh sáng, dòng điện, màu sắc, độ ẩm, nhiệt độ và v.v. cũng như là thiết bị cơ học để bẫy và diệt các côn trùng gây hại và khử côn trùng gây hại bằng cách chiếu xạ dựa trên đáp ứng của các côn trùng gây hại với các yếu tố vật lý trong các điều kiện môi trường. Các phương pháp được áp dụng rộng rãi hiện nay chủ yếu bao gồm: thu hút bướm đêm bằng đèn, bẫy bằng cách sử dụng mồi như siro axit axetic, và bẫy và diệt bướm đêm bằng cách ngâm và tưới 500 dipterex sử dụng cành liễu. Mặc dù các phương pháp trên đây đều có hiệu quả kiểm soát ở mức độ nào đó, song các phương pháp này vẫn còn khó khăn nhất định trong quá trình thực hiện.

Để giải quyết được mặt hạn chế của phương pháp kiểm soát nông nghiệp,

phương pháp kiểm soát hóa học và phương pháp kiểm soát vật lý khi sử dụng trong thực tế, trong quá trình nghiên cứu các nhà khoa học đã phát hiện ra rằng nếu các gen trừ sâu mã hóa các protein trừ sâu được biến nạp vào cây trồng, thì một vài cây chuyển gen trừ sâu có thể được tạo ra để kiểm soát côn trùng gây hại ở cây trồng. Protein trừ sâu Vip3A là một trong số nhiều protein trừ sâu. Đây là một protein đặc hiệu được tạo ra bởi *Bacillus cereus*.

Protein Vip3A có tác dụng làm độc và diệt các côn trùng gây hại nhạy cảm bằng cách kích hoạt sự chết theo chương trình của các loại tế bào. Protein Vip3A được thủy phân thành bốn sản phẩm protein chính trong ruột của côn trùng, trong đó, chỉ một protein hydrolysat (33KD) là cấu trúc lõi thể hiện tính độc của protein Vip3A. Protein Vip3A gắn kết với các tế bào biểu mô của ruột giữa của các côn trùng nhạy cảm, nhờ đó gây chết theo chương trình, mà có thể dẫn đến phân hủy tế bào biểu mô của ruột giữa để gây chết côn trùng. Protein Vip3A không gây bệnh bất kỳ ở côn trùng không nhạy cảm, vì thế không gây chết tế bào biểu mô ở ruột giữa theo chương trình và không gây phân hủy tế bào.

Đã được chứng minh rằng cây trồng được cải biến di truyền bởi Vip3A có thể chống lại sự lan tràn của *Agrotis ypsilon* Rottemberg, *Spodoptera frugiperda*, *sesamia inferens*, *heliiothis zea* và các loài côn trùng khác thuộc bộ cánh vảy. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có một báo cáo nào về việc kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng bằng cách tạo ra cây chuyển gen biểu hiện protein Vip3A.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại, cụ thể là đề xuất phương pháp kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng bằng cách đầu tiên tạo ra cây chuyển gen biểu hiện protein Vip3A, điều này đã khắc phục được các nhược điểm về mặt kỹ thuật của phương pháp kiểm soát nông nghiệp, phương pháp kiểm soát hóa học, phương pháp kiểm soát vật lý và phương pháp kiểm soát khác một cách hiệu quả trong giải pháp đã biết.

Theo khía cạnh thứ nhất sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, trong đó côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp

xúc với protein Vip3A.

Theo một vài phương án, protein Vip3A là protein Vip3Aa.

Theo các phương án khác, protein Vip3Aa tồn tại trong tế bào cây trồng tổng hợp protein Vip3Aa, và côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3Aa nhờ ăn tế bào cây trồng.

Theo các phương án khác, protein Vip3Aa tồn tại trong cây chuyển gen tổng hợp protein Vip3Aa, côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3Aa nhờ ăn các mô của cây chuyển gen, và sau khi tiếp xúc, sự phát triển của côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bị ức chế và/hoặc côn trùng gây hại *Spodoptera litura* chết, nhờ đó kiểm soát được sự gây hại của côn trùng *Spodoptera litura* đối với cây trồng.

Cây chuyển gen có thể ở giai đoạn phát triển bất kỳ.

Mô của cây chuyển gen được chọn từ lá, thân, cò, cụm hoa cái, bao phấn, chỉ nhị và quả.

Kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng không thay đổi khi thay đổi vị trí trồng và/hoặc thời điểm trồng.

Cây trồng được chọn từ cây ngô, cây đậu tương, cây bông, cây khoai lang, cây khoai sọ, cây sen, cây điền thanh, cây thuốc lá, cây củ cải đường, cây cải bắp và cây cà tím. Tốt hơn là, cây trồng được chọn từ cây ngô và cây đậu tương.

Trước bước tiếp xúc là bước trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Vip3Aa.

Theo một vài phương án, trình tự axit amin của protein Vip3Aa bao gồm: 1) trình tự axit amin như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, 2) trình tự axit amin có ít nhất 70% tính tương đồng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 và có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, hoặc 3) trình tự axit amin thu được từ trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 nhờ thay thế, mất và/hoặc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin và có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 gốc axit amin.

Theo một vài phương án, trình tự nucleotit mã hóa của protein Vip3Aa bao

gồm: 1) trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, 2) trình tự nucleotit có ít nhất là 75% tính tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, 3) trình tự nucleotit lai với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, 4) trình tự nucleotit khác biệt với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 do thoái hóa codon và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

Theo một vài phương án, cây trồng cũng chứa ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác so với trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3Aa.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry1Fa hoặc protein Cry 1Ba.

Cũng theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Theo một vài phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế gen quan trọng ở sâu bọ và côn trùng gây hại đích.

Theo khía cạnh thứ hai sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein Vip3A để kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

Theo một vài phương án, protein Vip3A là protein Vip3Aa.

Theo các phương án khác, trình tự axit amin của protein Vip3Aa bao gồm: 1) trình tự axit amin như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, 2) trình tự axit amin có ít nhất là 70% tính tương đồng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 và có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, hoặc 3) trình tự axit amin thu được từ trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 nhờ thay thế, mất và/hoặc

thêm một hoặc nhiều gốc axit amin và có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 gốc axit amin.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit mã hóa của protein Vip3Aa bao gồm: 1) trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, 2) trình tự nucleotit có ít nhất là 75% tính tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, 3) trình tự nucleotit lai với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, 4) trình tự nucleotit khác biệt với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 do thoái biến codon và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

Theo một vài phương án, protein Vip3A kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bằng phương pháp sau: cho protein Vip3A biểu hiện trong tế bào cây trồng và cho côn trùng gây hại *Acronycta rumicis* ăn tế bào cây trồng này, nhờ đó tiếp xúc với protein Vip3A.

Theo một vài phương án, protein Vip3A kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bằng phương pháp sau: cho protein Vip3A biểu hiện trong cây chuyển gen và cho côn trùng gây hại *Spodoptera litura* ăn các mô của cây chuyển gen, nhờ đó tiếp xúc với protein Vip3A.

Cây chuyển gen có thể ở giai đoạn phát triển bất kỳ.

Mô của cây chuyển gen được chọn từ lá, thân, quả, cò, cụm hoa cái, bao phấn và chỉ nhị.

Việc kiểm soát của protein Vip3A đối với côn trùng gây hại *Spodoptera litura* không thay đổi theo sự thay đổi vị trí trồng và/hoặc thời điểm trồng.

Cây trồng được chọn từ cây ngô, cây đậu tương, cây bông, cây khoai lang, cây khoai sọ, cây sen, cây điền thanh, cây thuốc lá, cây củ cải đường, cây cải bắp và cây cà tím. Tốt hơn là, cây trồng được chọn từ cây ngô và cây đậu tương.

Theo một vài phương án, cây trồng cũng chứa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3Aa.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry1Fa hoặc protein Cry 1Ba.

Cũng theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Theo một vài phương án, trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế các gen quan trọng ở sâu bọ và côn trùng gây hại đích.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*. Phương pháp này bao gồm đưa trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3A vào trong tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen, tốt hơn là, đưa trình tự nucleotit mã hóa của protein Vip3A vào bộ gen của tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen.

Theo một vài phương án, bộ phận của cây chuyển gen là các nguyên liệu nhân giống hoặc nguyên liệu không nhân giống.

Nguyên liệu nhân giống được dùng để chỉ quả, hạt hoặc mô sẹo.

Nguyên liệu không nhân giống được dùng để chỉ lá, thân, cò, cụm hoa cái, bao phấn hoặc chỉ nhị không có khả năng sinh sản.

Theo một vài phương án, protein Vip3A là protein Vip3Aa.

Theo các phương án khác, trình tự axit amin của protein Vip3Aa bao gồm: 1) trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, 2) trình tự axit amin có ít nhất 70% tính tương đồng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 và có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, hoặc 3) trình tự axit amin thu được từ trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 nhờ thay thế, mất và/hoặc thêm một hoặc nhiều gốc axit amin và có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50 gốc axit amin.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit mã hóa của protein Vip3Aa bao

gồm: 1) trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, 2) trình tự nucleotit có ít nhất là 75% tính tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, ví dụ, ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, 3) trình tự nucleotit lai với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, 4) trình tự nucleotit khác biệt với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 do thoái biến codon và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

Cây trồng được chọn từ cây ngô, cây đậu tương, cây bông, cây khoai lang, cây khoai sọ, cây sen, cây điền thanh, cây thuốc lá, cây củ cải đường, cây cải bắp và cây cà tím. Tốt hơn là, cây trồng được chọn từ cây ngô và cây đậu tương.

Theo một vài phương án, phương pháp này cũng bao gồm đưa ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3A vào tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen, tốt hơn là, đưa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3A vào bộ gen của tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen.

Theo một vài phương án, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry1Fa, hoặc protein Cry 1Ba.

Cũng theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Theo một vài phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế các gen quan trọng ở sâu bọ và côn trùng gây hại đích.

Theo một vài phương án, trình tự nucleotit mã hóa được đưa vào tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen thông qua phương pháp biến nạp qua trung gian *agrobacterium tumefaciens*, bắn phá phát xạ vết, phân giải

trực tiếp ADN trong tế bào trần, xung điện hoặc biến nạp ADN qua trung gian sợi tinh thể silic oxit, tốt hơn là, biến nạp qua trung gian *agrobacterium tumefaciens*.

Theo khía cạnh thứ tư sáng chế đề cập đến tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được tạo ra bằng phương pháp nêu trong khía cạnh thứ ba trên đây.

Theo khía cạnh thứ năm sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein Vip3A để tạo ra tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*. “Protein Vip3A”, “kiểm soát/việc kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*”, “cây trồng”, “tế bào cây trồng”, “cây chuyển gen” và “bộ phận của cây chuyển gen” có liên quan đến khía cạnh này cũng như là nội dung mở rộng của chúng được xác định như các khía cạnh nêu trên.

Theo khía cạnh thứ sáu sáng chế đề cập đến phương pháp trồng cây mà kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, bao gồm:

gieo ít nhất một loại hạt mang bộ gen chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Vip3A;

để hạt phát triển thành cây;

để cây phát triển trong điều kiện mà côn trùng *Spodoptera litura* gây hại nhờ lây nhiễm nhân tạo và/hoặc xuất hiện tự nhiên, và thu hoạch cây có mức độ phá hoại giảm và/hoặc có sản lượng tăng so với cây khác không mang trình tự polynucleotit mã hóa protein Vip3A.

“Protein Vip3A” và “cây trồng” có liên quan đến khía cạnh này cũng như là nội dung mở rộng của chúng được xác định như các khía cạnh nêu trên. Nghĩa của thuật ngữ “kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*” là tương tự với nghĩa của thuật ngữ “chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura*”. Các định nghĩa cụ thể được mô tả trên đây.

Theo sáng chế, sự biểu hiện protein Vip3A trong một cây chuyển gen cũng có thể được kèm theo sự biểu hiện của một hoặc nhiều protein trừ sâu loại Vip và/hoặc loại Cry. Việc đồng biểu hiện nhiều hơn một protein trừ sâu trong cùng một cây chuyển gen này có thể được thực hiện bằng kỹ thuật di truyền, để tạo ra cây trồng chứa và biểu hiện gen cần thiết. Ngoài ra, một cây trồng (cây bố mẹ thứ nhất) có thể biểu hiện protein Vip3A nhờ kỹ thuật di truyền, và cây trồng thứ hai (cây bố

mẹ thứ hai) có thể biểu hiện các protein trừ sâu loại Vip và/hoặc loại Cry nhờ kỹ thuật di truyền. Cây con biểu hiện tất cả các gen của cây bố mẹ thứ nhất và cây bố mẹ thứ hai được đưa vào được tạo ra bằng cách lai cây bố mẹ thứ nhất và cây bố mẹ thứ hai.

Quá trình can thiệp ARN (ARNi) được dùng để chỉ hiện tượng thoái biến đặc hiệu và có hiệu quả cao của mRNA tương đồng được bảo toàn cao được gây ra bởi ARN mạch kép (dsARN) trong quá trình tiến hóa. Do đó, theo sáng chế, công nghệ ARNi có thể được sử dụng để loại đặc hiệu hoặc kết thúc sự biểu hiện gen đặc hiệu ở các côn trùng và sâu bọ đích.

Theo một vài phương án, sáng chế cũng đề cập đến nội dung sau:

Điểm 1: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, khác biệt ở chỗ phương pháp này cho phép côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3A.

Điểm 2: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 1, khác biệt ở chỗ protein Vip3A là protein Vip3Aa.

Điểm 3: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 2, khác biệt ở chỗ protein Vip3Aa tồn tại trong tế bào cây trồng tổng hợp protein Vip3Aa và côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3Aa nhờ ăn tế bào cây trồng.

Điểm 4: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 3, khác biệt ở chỗ protein Vip3Aa tồn tại trong cây chuyển gen tổng hợp protein Vip3Aa, côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3Aa nhờ ăn mô của cây chuyển gen, sự phát triển của côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được ức chế sau khi tiếp xúc, mà cuối cùng dẫn đến chết, nhờ đó kiểm soát được sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng.

Điểm 5: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 4, khác biệt ở chỗ cây chuyển gen có thể ở giai đoạn phát triển bất kỳ.

Điểm 6: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 4, khác biệt ở chỗ mô của cây chuyển gen có thể là lá, thân, cò, cụm hoa cái, bao phấn, chỉ nhị hoặc quả.

Điểm 7: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo

điểm 4, khác biệt ở chỗ việc kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng không thay đổi theo sự thay đổi vị trí trồng.

Điểm 8: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 4, khác biệt ở chỗ việc kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng không thay đổi theo sự thay đổi thời điểm trồng.

Điểm 9: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 8, khác biệt ở chỗ cây trồng này được chọn từ cây ngô, cây đậu tương, cây bông, cây khoai lang, cây khoai sọ, cây sen, cây điền thanh, cây thuốc lá, cây củ cải đường, cây cải bắp và cây cà tím.

Điểm 10: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 9, khác biệt ở chỗ bước trước bước tiếp xúc là trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Vip3Aa.

Điểm 11: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 10, khác biệt ở chỗ trình tự axit amin của protein Vip3Aa có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

Điểm 12: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 11, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit của protein Vip3Aa có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.

Điểm 13: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 12, khác biệt ở chỗ cây trồng này cũng có thể tạo ra ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với protein Vip3Aa.

Điểm 14: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 13, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit thứ hai có thể mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.

Điểm 15: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 14, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit thứ hai có thể mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry1Fa, hoặc protein Cry 1Ba.

Điểm 16: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 15, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit thứ hai chứa trình tự nucleotit được thể

hiện bởi hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

Điểm 17: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 13, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế các gen quan trọng ở côn trùng và sâu bọ đích.

Điểm 18: Sử dụng protein Vip3A để kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

Mô tả văn tắt hình vẽ

FIG.1 là sơ đồ cấu trúc của vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T chứa trình tự nucleotit Vip3Aa-01 theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

FIG.2 là sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066 chứa trình tự nucleotit Vip3Aa-01 theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

FIG.3 sơ đồ cấu trúc của vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100002 chứa trình tự nucleotit Vip3Aa-01 theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

FIG.4 là hình ảnh thể hiện tác dụng trừ sâu của cây ngô chuyển gen lây nhiễm *Spodoptera litura* theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

FIG.5 là hình ảnh thể hiện tác dụng trừ sâu của cây đậu tương chuyển gen lây nhiễm *Spodoptera litura* theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Spodoptera litura và *Spodoptera frugiperda* đều thuộc họ bướm đêm, bộ cánh vảy. Cả hai loại côn trùng này đều là côn trùng ăn tạp và gây hại với cây ngô, cây đậu tương, cây bông và cây khoai lang. Tuy nhiên, *Spodoptera litura* và *Spodoptera frugiperda* là các loài khác nhau hoàn toàn về mặt sinh học và có các điểm khác biệt chính sau:

1. Các tập tính ăn khác nhau: *Spodoptera litura* là một loại côn trùng ăn

tạp và háu ăn và gây hại ở từng giai đoạn và lan tràn. *Spodoptera litura* gây hại với nhiều loại vật chủ, ăn gần 300 loại cây, như, cây khoai lang, cây bông, cây khoai sọ, cây sen, cây điền thanh, cây đậu tương, cây thuốc lá, cây củ cải đường cũng như là các loại rau thuộc họ cải và họ cà v.v.. *Spodoptera frugiperda* là một loại côn trùng ăn tạp, nhưng thích các cây họ lúa hơn, thường gây hại với cỏ dại, cây ngô, cây lúa, cây lúa miến, cây mía, cũng gây hại với cả cây bông, cây họ cải, cây họ bầu bí, cây đậu phộng, cây cỏ linh lăng, cây hành, cây thuộc chi đậu, cây khoai lang, cây cà chua và cây họ cà khác (cây cà tím, cây thuốc lá, cây ớt), giống cây cảnh (cây họ cúc, hoa cẩm chướng, cây thuộc chi mỏ hạc).

2. Vùng phân bố khác nhau: *Spodoptera litura* được phân bố trên toàn thế giới, và xuất hiện ở tất cả các nơi của Trung Quốc, chủ yếu ở tỉnh Giang Tây, Giang Tô, Hồ Nan, Hồ Bắc, Chiết Giang và An Huy của lưu vực sông Dương Tử cũng như là các tỉnh như Hà Nam, Hà Bắc và Sơn Đông của lưu vực sông Hoàng Hà. *Spodoptera frugiperda* chủ yếu phân bố ngoài Trung Quốc, bao gồm Canada, Mexico, Mỹ, Ac-hen-tina, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Ecuador, Guyan thuộc Pháp, Guyan, Paraguay, Peru, Surinam, Uruguay và Venezuela của lục địa Mỹ cũng như là toàn bộ vùng trung Mỹ và vùng biển Caribe. Trong khi đó không có báo cáo nào chỉ ra rằng *Spodoptera frugiperda* xuất hiện ở Trung Quốc.

3. Đặc tính phá hoại khác nhau: Côn trùng *Spodoptera lituras* gây hại với toàn bộ cây ở giai đoạn ấu trùng, sống trên mặt sau của lá thành nhóm và gặm biểu bì dưới và thịt lá, chỉ để lại biểu bì trên ở dạng đốm trong suốt khi chúng ở giai đoạn tuổi non. Sau tuổi ba, chúng sẽ phát tán và gây hại với lá và thân non. Sau tuổi tư, chúng trở nên tham ăn và gặm lá, chỉ để lại gân lá chính: ấu trùng trưởng thành có thể ăn vào quả; các tập tính ăn của chúng là ăn tạp và gây hại với tất cả các cơ quan. Các côn trùng này háu ăn khi chúng ở giai đoạn hóa già, vì thế chúng là loài côn trùng rất nguy hiểm. Trong khi đó *Spodoptera frugiperda* ăn lá vì thế có thể khiến lá rụng, sau đó, chúng sẽ chuyển sang gây hại. Đôi khi, một lượng lớn ấu trùng gây hại bằng cách cắn đứt rễ, cắn đứt thân của cây giống con và cây non. Ở một vài cây trồng lớn hơn, như lõi ngô, ấu trùng có thể gây hại bằng cách đục thủng bên trong. Khi chúng ăn lá ngô, chúng sẽ để lại một lượng lớn các lỗ. Sau khi được ăn bởi ấu trùng non, gân lá sẽ có hình giống cửa sổ. Giống như sâu ăn rễ, ấu trùng

già hơn có thể cắn đứt cây giống con khỏi rễ trong 30 ngày. Nếu lượng quần thể côn trùng lớn, thì ấu trùng có thể tuần hành, mở rộng thành nhóm. Nếu môi trường thuận lợi, chúng thường cư trú trong cỏ.

4. Các đặc điểm hình thái khác nhau

- 1) Hình thái trứng khác nhau: trứng của *Spodoptera litura* có hình bán cầu dẹt. Khi mới đẻ trứng, trứng có màu trắng hơi vàng và sau đó chuyển sang màu xám sẫm, dính với nhau thành dạng khối, được phủ lông tơ màu nâu. Trong khi đó, trứng của *Spodoptera frugiperda* có hình bán cầu, khối trứng được đẻ trên bề mặt của lá, mỗi khối trứng bao gồm 100-300 trứng, đôi khi khối trứng có dạng lớp hình chữ Z, bề mặt của khối trứng có các lớp bảo vệ dạng dải được tạo thành bởi lông màu xám ở bụng của con cái.
- 2) Hình thái ấu trùng khác nhau: ấu trùng của *Spodoptera litura* có chiều dài nằm trong khoảng từ 33 đến 50mm. Đầu của chúng có màu nâu đen. Màu của ngực thì khác nhau, từ màu vàng đất đến màu xanh hơi đen. Các chấm trắng nhỏ được phân bố rải rác khắp bề mặt cơ thể. Có một cặp chấm đen hình bán nguyệt tương tự với hình tam giác vào ngày đông chí. Ấu trùng thường có sáu tuổi. Trong khi đó, toàn bộ cơ thể của ấu trùng *Spodoptera frugiperda* lại có màu xanh khi chúng mới được sinh ra, và có các chấm và đường màu đen. Khi tăng trưởng, toàn bộ cơ thể của chúng vẫn giữ nguyên màu xanh và chuyển sang màu vàng nhạt, và có các đường màu đen ở lưng và các đường lỗ thở. Khi đông đúc (mật độ quần thể lớn và lượng thức ăn thiếu), ấu trùng ở giai đoạn cuối hầu như có màu đen khi chúng ở giai đoạn di cư. Thân của ấu trùng già có chiều dài nằm trong khoảng từ 35 đến 40mm, đầu của chúng có các chấm màu vàng và có hình chữ "Y" đảo ngược. Các lông cứng đầu tiên được gắn vào lông cứng ở lưng thành nhóm (cả hai bên sườn ở mỗi đốt có hai lông cứng). Đốt cuối của bụng có bốn chấm đen được sắp xếp thành hình vuông. Ấu trùng có sáu thời kỳ, hoặc hiếm khi có 5 thời kỳ.
- 3) Hình thái con nhộng khác nhau: Nhộng của *Spodoptera litura* thường có chiều dài nằm trong khoảng từ 15 đến 20mm. Chúng có hình trụ và màu nâu đỏ. Đuôi của chúng có một cặp gai ngắn. Trong khi đó, nhộng của *Spodoptera frugiperda* có màu nâu và bóng, và có chiều dài nằm trong khoảng từ 18 đến

20mm.

- 4) Hình thái con trưởng thành khác nhau: Các con trưởng thành của *Spodoptera litura* có chiều dài nằm trong khoảng từ 14 đến 20mm, sải cánh nằm trong khoảng từ 35 đến 46mm, thân có màu nâu đen, mặt sau của ngực có cụm lông màu trắng, cánh trước có màu nâu hơi xám và có nhiều kiểu, đường ngang bên trong và bên ngoài có màu trắng và có hình lượn sóng, và ở giữa, có các vạch rộng và chéo màu trắng rõ. Vì lý do này, côn trùng này được gọi là *Spodoptera litura*. Trong khi đó, các con trưởng thành của *Spodoptera frugiperda* có lông ở ngực và có màu nâu sẫm, sải cánh của chúng nằm trong khoảng từ 32 đến 38mm. Cánh trước của con cái có màu từ xám đến nâu đậm, trong khi đó cánh trước của con đực lại đen hơn, và có các chấm đen và các đường màu sáng đậm. Cánh dưới có màu trắng, và các đường gân của cánh dưới có màu nâu và rõ nét. Cơ quan sinh dục ngoài của côn trùng nhỏ có hình vuông, các mấu bám cuối trong số các mấu bám bị khuyết; túi giao cấu của con cái không có bộ phận giao cấu.

5. Các tập tính tăng trưởng và quy luật xuất hiện khác nhau: *Spodoptera litura* có bốn thế hệ (phía Bắc Trung Quốc)-chín thế hệ (tỉnh Quảng Đông). Nói chung, ấu trùng trưởng thành hoặc nhộng qua đông trong cỏ dại trên các dây cánh đồng. Ở tỉnh Quảng Châu, trong thực tế côn trùng không qua đông. Ở vùng phía bắc của hạ lưu sông Dương Tử, côn trùng gây hại có thể được đóng băng như chết vào mùa đông, vì thế qua đông không phải là giai đoạn cuối. Đã được nghiên cứu rằng các côn trùng gây hại địa phương có thể được di trú từ phương Nam của Trung Quốc; loài côn trùng này bùng phát chủ yếu vào tháng bảy-tháng tám ở lưu vực sông Dương Tử, và chủ yếu vào tháng tám-tháng chín ở lưu vực sông Hoàng Hà. Các con trưởng thành có tập tính ăn đêm, có khả năng bay khỏe, có tính hướng sáng và có tính hướng hóa chất và đặc biệt nhạy cảm với đường, dấm, rượu và các sản phẩm lên men khác. Mọi bướm đêm cái có thể đẻ từ 3 đến 5 khối trứng. Mỗi khối trứng có từ 100 đến 200 trứng. Trứng chủ yếu được đẻ ở các ngã ba của gân lá ở mặt sau của lá. Trứng được đẻ nhiều ở các cây trồng xanh và sum xuê. Trứng được đẻ thành khối. Các khối trứng thường được phủ lông có vảy, vì thế có thể dễ dàng tìm thấy chúng. Nhiệt độ thích hợp để cho trứng nở là 24°C. Giai đoạn ấu trùng kéo

dài từ 14 đến 20 ngày ở nhiệt độ môi trường bằng 25°C. Ấu trùng mới nở có tập tính sinh sống và gây hại theo nhóm. Sau tuổi ba, chúng bắt đầu phát tán. Ấu trùng trưởng thành có tập tính ăn đêm và đôi khi mất ý thức. Vào ban ngày, chúng chủ yếu trốn trong lớp đất. Khi trời tối, chúng bò ra và tìm kiếm thức ăn. Khi chúng sợ, chúng sẽ cuộn lại và giả vờ chết. Khi thức ăn không đủ hoặc không thích hợp, ấu trùng có thể di trú thành nhóm đến các cánh đồng bên cạnh để gây hại cho cánh đồng này. Do đó, chúng cũng thường được biết đến là “sâu đo”. Độ ẩm trong đất thích hợp để phát triển thành nhộng là 20% lượng nước trong đất. Giai đoạn nhộng kéo dài từ 11 đến 18 ngày. *Spodoptera litura* là loài côn trùng ưa nhiệt và chịu được nhiệt độ cao và gây hại tràn lan theo từng giai đoạn. Nhiệt độ thích hợp để phát triển ở mọi giai đoạn của côn trùng là từ 28 đến 30°C, tuy nhiên côn trùng gây hại cũng có thể sống bình thường trong điều kiện nhiệt độ cao (33-40°C). Chúng có khả năng chịu đựng kém với môi trường lạnh. Về cơ bản chúng không thể sống sót trong một thời gian dài ở nhiệt độ thấp khoảng 0°C vào mùa đông. Nói chung, các năm và mùa nóng là thích hợp cho sự phát triển và sinh sản của chúng. Nhiệt độ thấp có thể khiến cho nhộng chết hàng loạt. Côn trùng này là côn trùng ăn tạp, nhưng trong các trường hợp thức ăn phong phú, như các vật chủ khác nhau, ngay cả khi cùng một vật chủ ở các giai đoạn phát triển khác nhau hoặc các cơ quan khác nhau, và sự thiếu hụt hoặc đủ thức ăn có ảnh hưởng rõ rệt đến sự phát triển và sinh sản của nó. Các cánh đồng có trồng hoa màu xen vào, thì việc trồng gần như thừa hoặc nhiều loại cây trồng sẽ tạo điều kiện cho côn trùng xuất hiện. Các kẻ thù tự nhiên của côn trùng bao gồm ong ký sinh và virus đa diện ký sinh trên ấu trùng. Trong khi đó, *Spodoptera frugiperda* có khả năng bay di trú, và tự nó có thể phát tán trong một khoảng cách nhất định. Rau hoặc quả có ấu trùng là một cách quan trọng để truyền thông quốc tế. *Spodoptera frugiperda* có một thời gian bay di trú ở Mỹ trong một năm, sau đó lan ra toàn nước Mỹ. Ở trước giai đoạn đẻ trứng (sự phát triển trưởng thành về mặt giới tính), chúng sẽ lan ra rộng. Ở Mỹ, con trưởng thành có thể lợi dụng luồng gió chậm để phát tán từ Mississippi đến Canada trong khoảng thời gian ít hơn 30 giờ. Cuối mùa hè hoặc đầu mùa thu, ấu trùng thường di trú theo nhóm. Kết quả là, sự lan truyền cục bộ thành công có thể giúp làm giảm tỷ lệ chết của ấu trùng.

Tóm lại, *Spodoptera litura* và *Spodoptera frugiperda* là hai loài côn trùng gây hại khác nhau, có quan hệ huyết thống xa và không thể giao phối với nhau do đó không tạo ra các thế hệ tiếp theo.

Bộ gen của cây trồng, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng được mô tả trong sáng chế được dùng để chỉ nguyên liệu di truyền ở thực vật, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng và bao gồm nhân tế bào, plasmit và bộ gen của ty thể.

Thuật ngữ “tiếp xúc” trong sáng chế được dùng để chỉ côn trùng và/hoặc sâu bọ chạm, ở và/hoặc ăn cây trồng, các cơ quan của cây trồng, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng. Cây trồng, cơ quan cây trồng, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng được hiểu là chúng có thể biểu hiện các protein trừ sâu in vivo hoặc bề mặt của cây trồng, cơ quan cây trồng, mô cây trồng hoặc tế bào cây trồng có các protein trừ sâu hoặc vi sinh vật tổng hợp protein trừ sâu.

Thuật ngữ “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” dùng trong sáng chế có nghĩa là côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3A, và sau khi tiếp xúc, sự phát triển của côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bị ức chế và/hoặc côn trùng gây hại *Spodoptera litura* sẽ chết. Ngoài ra, côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3A nhờ ăn các mô cây trồng. Sau khi tiếp xúc, sự phát triển của toàn bộ hoặc một vài côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bị ức chế và/hoặc toàn bộ hoặc một vài trong số chúng sẽ chết. Ức chế có nghĩa là gần chết, tức là không có nghĩa là chết, nhưng có thể tạo ra các tác dụng nhất định lên các mặt nhất định như sự tăng trưởng và sự phát triển, tập quán, chức năng sinh lý, chức năng sinh hóa và các mô, ví dụ: sự tăng trưởng và phát triển chậm dần và/hoặc ngừng. Trong khi đó, cây trồng vẫn có hình thái bình thường và có thể được trồng bằng các phương pháp thông thường dùng để tiêu thụ và/hoặc tạo ra các sản phẩm. Ngoài ra, so với các cây trồng kiểu đại không chuyển gen, cây trồng và/hoặc hạt cây trồng kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* mà chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Vip3A có mức độ thiệt hại cây trồng giảm trong điều kiện mà côn trùng gây hại *Spodoptera litura* gây hại do lây nhiễm nhân tạo và/hoặc xuất hiện tự nhiên. Biểu hiện cụ thể là nhưng không chỉ giới hạn ở: khả năng chống chịu của thân được cải thiện, và/hoặc sản lượng và/hoặc khối lượng hạt tăng. Chức năng “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” của protein Vip3A đối với côn trùng gây hại

Spodoptera litura có thể tồn tại một cách độc lập và không giảm bớt và/hoặc biến mất do sự tồn tại của các chất khác mà có thể “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” côn trùng gây hại *Spodoptera litura*. Cụ thể là, nếu các mô của cây chuyển gen (chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Vip3A) đồng thời và/hoặc không đồng thời chứa và/hoặc tạo ra protein Vip3A và/hoặc chất khác mà có khả năng kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, thì sự tồn tại của chất khác này sẽ không làm ảnh hưởng đến chức năng “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” của protein Vip3A đối với *Spodoptera litura*, cũng như không thể dẫn đến việc chức năng “kiểm soát” và/hoặc “ngăn ngừa” hoàn toàn là do chất khác, mà không có liên quan đến protein Vip3A. Trong các điều kiện bình thường, trên đất canh tác, quá trình tiêu hóa các mô cây trồng bởi côn trùng gây hại *Spodoptera litura* diễn ra nhanh và khó có thể quan sát được bằng mắt thường, do đó, trong điều kiện mà côn trùng *Spodoptera litura* gây hại do lây nhiễm nhân tạo và/hoặc xuất hiện tự nhiên, nếu mô bất kỳ của cây chuyển gen (chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Vip3A) làm chết côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, và/hoặc ức chế sự phát triển của côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, và/hoặc sự phá hoại cây trồng được làm giảm so với cây trồng kiểu dại không chuyển gen, có nghĩa là phương pháp và cách sử dụng theo sáng chế được thực hiện, tức là: phương pháp và/hoặc sử dụng để kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được thực hiện bằng cách cho côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3A.

Polynucleotit và/hoặc nucleotit theo sáng chế tạo ra “gen” hoàn chỉnh và mã hóa protein hoặc polypeptit trong tế bào chủ cần thiết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng hiểu rằng polynucleotit và/hoặc nucleotit theo sáng chế có thể được đưa vào vật chủ đích dưới sự kiểm soát của trình tự điều hòa.

Như đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ADN thường tồn tại ở dạng mạch kép. Theo cấu trúc này, một mạch sẽ bổ sung với mạch còn lại, và ngược lại. Khi ADN tái bản và tạo ra mạch bổ sung còn lại của ADN trong cây trồng, sáng chế đề xuất việc sử dụng polynucleotit được liệt kê trong danh mục trình tự cũng như là mạch bổ sung của chúng. Thuật ngữ “mạch mã hóa” thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này được dùng để chỉ mạch liên

kết với mạch đối nghĩa. Để biểu hiện các protein in vivo, thông thường một mạch của ADN được phiên mã thành mạch bổ sung của ARN thông tin, mà có thể được dùng làm khuôn mẫu để dịch mã thành protein. Thực ra, ARN thông tin được phiên mã từ mạch “đối nghĩa” của ADN. Mạch “có nghĩa” hoặc “mã hóa” chứa một dãy các codon (codon bao gồm ba nucleotit. Khi ba nucleotit được đọc, có thể tạo ra một axit amin cụ thể). Mạch có nghĩa này có thể được sử dụng làm khung đọc mở (open reading frame-ORF) để tạo thành protein hoặc peptit đích. Sáng chế cũng đề xuất ARN và PNA (axit nucleic peptit) có các chức năng tương đương với ADN được lấy làm ví dụ.

Phân tử axit nucleic hoặc đoạn của nó theo sáng chế được lai với gen Vip3Aa theo sáng chế trong các điều kiện nghiêm ngặt. Phương pháp thông thường bất kỳ để lai hoặc khuếch đại axit nucleic có thể được sử dụng để xác định sự tồn tại của gen Vip3Aa theo sáng chế. Trong các điều kiện cụ thể, phân tử axit nucleic hoặc đoạn của nó có thể được lai đặc hiệu với các phân tử axit nucleic khác. Theo sáng chế, nếu hai phân tử axit nucleic có thể tạo thành cấu trúc axit nucleic mạch kép đối song song, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này có thể lai đặc hiệu với nhau. Nếu hai phân tử axit nucleic bổ sung hoàn toàn, thì một phân tử axit nucleic là “mạch bổ sung” của phân tử axit nucleic còn lại. Theo sáng chế, nếu mọi nucleotit của phân tử axit nucleic bổ sung với nucleotit tương ứng của phân tử axit nucleic khác, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này “bổ sung hoàn toàn với nhau”. Nếu hai phân tử axit nucleic có thể được lai với nhau trong điều kiện đủ ổn định, nhờ đó cho phép chúng bắt cặp và liên kết với nhau ít nhất là trong điều kiện “nghiêm ngặt kém” thông thường, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này “bổ sung với nhau ở mức tối thiểu”. Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai với nhau trong điều kiện đủ ổn định, nhờ đó cho phép chúng bắt cặp và liên kết với nhau ít nhất là trong điều kiện “nghiêm ngặt cao” thông thường, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này có “khả năng bổ sung”. Có thể chấp nhận không đạt được sự bổ sung hoàn toàn miễn là sự lệch bổ sung không ngăn cản hoàn toàn hai phân tử tạo ra cấu trúc mạch kép. Để cho phép một phân tử axit nucleic có thể được sử dụng làm đoạn môi hoặc mẫu dò, thì chỉ cần đảm bảo sự bổ sung đủ trên trình tự để tạo ra cấu trúc mạch kép ổn định trong dung môi cụ thể chấp nhận được

và ở nồng độ muối cụ thể.

Theo sáng chế, trình tự gần tương đồng là một đoạn của phân tử axit nucleic. Trong điều kiện rất nghiêm ngặt, phân tử axit nucleic này có thể lai đặc hiệu với mạch bổ sung của đoạn phân tử axit nucleic bắt cặp khác. Các điều kiện nghiêm ngặt thích hợp thúc đẩy quá trình lai ADN, như: ngâm với $6,0 \times \text{NaCl/Natri xitrat}$ (SSC) ở nhiệt độ 45°C , và sau đó rửa bằng $2,0 \times \text{SSC}$ ở nhiệt độ 50°C , được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, ở bước rửa, nồng độ muối có thể được chọn từ $2,0 \times \text{SSC}$ ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện nghiêm ngặt kém đến $0,2 \times \text{SSC}$ ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện nghiêm ngặt cao. Ngoài ra, điều kiện nhiệt độ ở bước rửa có thể được tăng từ nhiệt độ trong phòng $\sim 22^\circ\text{C}$ trong điều kiện nghiêm ngặt kém đến $\sim 65^\circ\text{C}$ trong điều kiện nghiêm ngặt cao. Cả điều kiện nhiệt độ và nồng độ muối đều có thể được thay đổi. Theo cách khác, một biến có thể không thay đổi và biến còn lại được thay đổi. Tốt hơn là, các điều kiện nghiêm ngặt được đề cập trong sáng chế có thể là: lai đặc hiệu với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 ở nhiệt độ 65°C trong $6 \times \text{SSC}$ 0,5% dung dịch SDS và rửa màng một lần bằng mỗi dung dịch $2 \times \text{SSC}$ 0,1% SDS và $1 \times \text{SSC}$ 0,1% SDS.

Do đó, các trình tự có hoạt tính trừ sâu và được lai với SEQ ID NO: 3 và/hoặc SEQ ID NO: 4 theo sáng chế trong các điều kiện nghiêm ngặt được bao gồm trong sáng chế. Các trình tự này có ít nhất là 40%-50% tính tương đồng, 60%, 65% hoặc 70% tính tương đồng, thậm chí ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc tính tương đồng trình tự cao hơn với trình tự theo sáng chế.

Các gen và protein theo sáng chế không chỉ bao gồm các trình tự được lấy làm ví dụ cụ thể mà còn bao gồm các phần và/hoặc các đoạn (chúng được bao gồm trong protein có chiều dài đầy đủ và/hoặc đoạn cuối được loại bỏ), các biến thể, các thể đột biến, các đoạn thay thế (protein chứa axit amin được thay thế), các thể khảm và các protein dung hợp, mà duy trì các đặc tính có hoạt tính trừ sâu của protein trong các ví dụ cụ thể. Thuật ngữ “biến thể” hoặc “biến đổi” được dùng để chỉ trình tự nucleotit mã hóa cùng một protein hoặc mã hóa protein tương đương có hoạt tính trừ sâu. Thuật ngữ “protein tương đương” được dùng để chỉ protein có hoạt tính sinh học chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura* là giống hoặc về cơ bản

giống hoạt tính sinh học của protein được bảo hộ.

Thuật ngữ “đoạn” hoặc “phân đoạn” của các phân tử ADN hoặc trình tự protein theo sáng chế được dùng để chỉ một phần hoặc dạng được cải biến nhân tạo (ví dụ, các trình tự này thích hợp để biểu hiện trong cây trồng) của ADN gốc hoặc trình tự protein (nucleotit hoặc axit amin) có liên quan. Chiều dài của các trình tự nêu trên có thể thay đổi, nhưng đủ để đảm bảo các protein (được mã hóa) là các độc tố đối với côn trùng.

Bằng cách sử dụng các công nghệ chuẩn, các gen có thể được cải biến và các biến thể gen có thể dễ dàng được tạo ra. Ví dụ, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rất rõ công nghệ gây đột biến điểm. Theo một ví dụ khác, patent Mỹ số 5605793 mô tả phương pháp ghép ADN để thu được tính đa dạng phân tử khác sau khi đứt đoạn ngẫu nhiên. Endonucleaza bán trên thị trường có thể được sử dụng để tạo ra các đoạn gen có chiều dài đầy đủ, và exonucleaza có thể được sử dụng theo quy trình chuẩn. Ví dụ, enzym, như: *Bal31* hoặc đột biến trực tiếp vị trí có thể được sử dụng để bất hoạt hoàn toàn nucleotit từ đầu của các gen này. Theo cách khác, nhiều endonucleaza giới hạn có thể được sử dụng để thu được các gen có các đoạn có hoạt tính mã hóa. Các đoạn có hoạt tính này có thể được tạo ra trực tiếp bằng cách sử dụng proteaza.

Sáng chế có thể thu được các protein và/hoặc các gen tương đương mã hóa các protein tương đương này từ các chủng phân lập *B.t.* và/hoặc thư viện ADN. Các protein trừ sâu theo sáng chế có thể thu được bằng nhiều phương pháp. Ví dụ, các kháng thể chứa các protein trừ sâu được mô tả và được bảo hộ bởi sáng chế có thể được sử dụng để xác định và tách các protein khác từ hỗn hợp protein. Cụ thể là, các kháng thể có thể được tổng hợp bởi các protein bất biến nhất và khác biệt nhất từ các protein *B.t.* khác. Sau đó bằng cách kết tủa miễn dịch, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch có gắn enzym (enzym-linked immunosorbent assay-ELISA) hoặc phương pháp thẩm tách Tây, các kháng thể này được sử dụng để chuyên xác định các protein tương đương có hoạt tính đặc trưng. Các quy trình chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để có thể dễ dàng tạo ra các protein, hoặc các protein tương đương, hoặc kháng thể chứa các đoạn của các protein này được mô tả trong sáng chế. Sau đó từ các vi sinh vật có thể thu được các gen mã hóa các protein

này.

Do dư thừa các codon di truyền, nên các trình tự ADN khác nhau có thể mã hóa cùng một trình tự axit amin. Việc tạo ra các trình tự ADN thay thế được mã hóa các protein giống nhau hoặc về cơ bản giống nhau là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các trình tự ADN khác nhau này được bao gồm trong phạm vi sáng chế. Các trình tự “về cơ bản giống nhau” được dùng để chỉ các trình tự được thay thế, mất, thêm hoặc cài axit amin, nhưng về bản chất không làm ảnh hưởng đến hoạt tính trừ sâu, cũng bao gồm các đoạn vẫn giữ được hoạt tính trừ sâu.

Thay thế, mất hoặc thêm axit amin theo sáng chế là kỹ thuật phổ biến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn là, thay thế axit amin này là: sự thay đổi nhỏ về các đặc tính, thay thế axit amin bảo toàn không tác động nhiều đến khả năng gấp protein và/hoặc hoạt tính; mất ít, thông thường là mất khoảng 1-30 axit amin; kéo dài thêm ít ở đầu amino hoặc carboxyl, ví dụ: một gốc methionin được kéo dài từ đầu amino; peptit liên kết nhỏ, ví dụ, có chiều dài gồm 20 đến 25 gốc.

Ví dụ về thay thế bảo toàn là thay thế xảy ra ở các nhóm axit amin dưới đây: axit amin có tính bazơ (như: arginin, lysin và histidin), axit amin có tính axit (như: axit glutamic và axit aspartic), axit amin phân cực (như: glutamin và asparaginat), axit amin kỵ nước (như: leuxin, isoleuxin và valin), axit amin thơm (như: phenylalanin, tryptophan và tyrosin), và axit amin tiểu phân tử (như: glyxin, alanin, serin, threonin và methionin). Các thay thế axit amin này thường không làm thay đổi hoạt tính đặc hiệu là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả trong tài liệu ‘Protein’ được công bố bởi N. Neurath và R. L. Hill, Academic Press, 1979. Các thay thế lẫn nhau phổ biến nhất là Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu và Asp/Gly, cũng như là các thay thế lẫn nhau ngược lại.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng thay thế này có thể xảy ra bên ngoài các vùng mà có thể đóng một vai trò quan trọng đối với các chức năng phân tử, và vẫn tạo ra các polypeptit có hoạt tính. Đối với các polypeptit theo sáng chế, gốc axit amin cần để thu được hoạt tính này và nhờ đó không được chọn để thay thế có thể được xác định bằng các phương pháp đã biết

trong lĩnh vực kỹ thuật này, như: gây đột biến trực tiếp vị trí hoặc gây đột biến sàng lọc alanin (ví dụ, xem tài liệu Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). Công nghệ gây đột biến sàng lọc alanin được dùng để gây đột biến ở mọi gốc có điện tích dương trong phân tử và phát hiện hoạt tính trừ sâu của phân tử được đột biến, nhờ đó xác định được gốc axit amin quan trọng đối với hoạt tính của phân tử này. Vị trí tương tác cơ chất-enzym cũng có thể được xác định bằng cách phân tích cấu trúc ba chiều. Cấu trúc ba chiều này có thể được phân tích bằng phân tích NMR, tinh thể học, đánh dấu ái lực quang và các kỹ thuật khác (ví dụ, xem tài liệu de Vos et al, 1992, Science 255: 306-312; Smith et al, 1992, J. Mol. Biol 224: 899-904; Wlodaver et al, 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

Theo sáng chế, protein Vip3A bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: protein Vip3Aa1, Vip3Af1, Vip3Aa11, Vip3Aa19, Vip3Ah1, Vip3Ad1, Vip3Ae1 hoặc Vip3Aa20, hoặc các đoạn trừ sâu hoặc các vùng chức năng có ít nhất là 70% tính tương đồng với trình tự axit amin của các protein nêu trên và có hoạt tính trừ sâu chống lại *Spodoptera litura*.

Do đó, trình tự axit amin có tính tương đồng nhất định với các trình tự axit amin được thể hiện bởi trình tự 1 và/hoặc 2 cũng được bao gồm trong sáng chế. Thông thường, tính tương đồng/tính đồng nhất của các trình tự này với các trình tự theo sáng chế là lớn hơn 60%, tốt hơn là lớn hơn 75%, tốt hơn nữa là lớn hơn 80%, cũng tốt hơn nữa là lớn hơn 90%, và có thể lớn hơn 95%. Theo cách khác, polynucleotit và protein được ưu tiên theo sáng chế có thể được xác định theo khoảng tính đồng nhất và/hoặc tính tương đồng cụ thể hơn. Ví dụ, có 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% tính đồng nhất và/hoặc tính tương đồng với các trình tự được thể hiện trong sáng chế.

Các trình tự điều hòa theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: trình tự khởi đầu, peptit chuyển tiếp, trình tự kết thúc, trình tự tăng cường, trình tự dẫn, intron và các trình tự điều hòa khác mà có thể được liên kết hoạt động với protein Vip3A và protein loại Cry.

Trình tự khởi đầu là trình tự khởi đầu có thể được biểu hiện trong cây trồng. Thuật ngữ “trình tự khởi đầu có thể biểu hiện được trong cây trồng” được dùng để chỉ trình tự khởi đầu mà đảm bảo trình tự mã hóa liên kết với nó được biểu hiện trong các tế bào cây trồng. Các trình tự khởi đầu biểu hiện được trong cây trồng có thể là các trình tự khởi đầu cơ bản. Các ví dụ về các trình tự khởi đầu điều khiển sự biểu hiện cơ bản ở cây trồng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: trình tự khởi đầu 35S thu được từ virus khảm ở cây súp lơ, trình tự khởi đầu ubi ở cây ngô, trình tự khởi đầu của gen GOS2 ở cây lúa và v.v.. Theo cách khác, trình tự khởi đầu có thể biểu hiện được trong cây trồng có thể là trình tự khởi đầu có tính đặc hiệu mô. Nói cách khác, khi điều khiển trình tự khởi đầu này, ví dụ trình tự khởi đầu PEP carboxylaza, thì mức biểu hiện của các trình tự mã hóa ở một vài mô của cây trồng như các mô xanh là cao hơn mức biểu hiện ở các mô khác (điều này có thể được xác định bằng thử nghiệm ARN thông thường). Theo cách khác, trình tự khởi đầu biểu hiện được trong cây trồng có thể là trình tự khởi đầu được đưa vào bằng cách rạch. Trình tự khởi đầu được đưa vào bằng cách rạch hoặc trình tự khởi đầu điều khiển kiểu biểu hiện bằng cách rạch được dùng để chỉ là khi cây trồng được rạch bằng máy hoặc bị thương do côn trùng gặm nhấm, thì sự biểu hiện của trình tự mã hóa trong điều kiện điều hòa trình tự khởi đầu được tăng lên đáng kể so với các điều kiện phát triển bình thường. Ví dụ về các trình tự khởi đầu được đưa vào bằng cách rạch bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: các trình tự khởi đầu của các gen ức chế proteaza ở cây khoai tây và cây cà chua (pin I và pin II) và trình tự khởi đầu của các gen ức chế proteaza ở cây ngô (MPI).

Các peptit chuyển tiếp (cũng được biết đến là trình tự tín hiệu bí mật hoặc trình tự dẫn) dẫn các sản phẩm chuyển gen tới các cơ quan cụ thể hoặc các khoang tế bào. So với các protein thụ thể, các peptit chuyển tiếp có thể là khác loại. Ví dụ, gen lục lạp mã hóa trình tự peptit chuyển tiếp được dùng để nhằm vào lục lạp, hoặc trình tự duy trì ‘KDEL’ được sử dụng để nhằm vào màng lưới nội chất, hoặc CTPP của gen lectin của lúa mạch được sử dụng để nhằm vào không bào.

Các trình tự dẫn bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, trình tự dẫn của virus ARN nhỏ, như: trình tự dẫn của EMCV (vùng không mã hóa 5' của virus gây viêm não cơ tim); trình tự dẫn của nhóm potyvirus, như: trình tự dẫn của MDMV (virus

khảm ở cây ngô lùn); protein gắn kết chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người (BiP); trình tự dẫn của mARN không được dịch mã của protein vỏ của alfamovirut (AMV RNA4); trình tự dẫn của virut khảm ở cây thuốc lá (TMV).

Các gen tăng cường bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: gen tăng cường của virut khảm ở cây suplor (cauliflower mosaic virus-CaMV), gen tăng cường của virut khảm ở cây huyền sâm (figwort mosaic virus-FMV), gen tăng cường của virut vòng xâm thực của cây cẩm chướng (carnation etched ring virus-CERV), gen tăng cường của virut khảm ở gân lá cây sắn (cassava vein mosaic virus-CsVMV), gen tăng cường của virut khảm ở cây hoa bốn giờ (mirabilis mosaic virus-MMV), gen tăng cường của virut cuộn lá vàng ở cây hoa dạ hương (cestrum yellow leaf curl virus-CmYLCV), gen tăng cường của virut multan cuộn lá ở cây bông Multan (Multan cây bông leaf curl multan virus-CLCuMV), gen tăng cường của virut gây chấm lốm đốm vàng lá ở cây thài lài (commelina yellow mottle virus-CoYMV) và gen tăng cường của virut gây sọc úa vàng lá ở cây lạc (peanut chlorotic streak virus-PCLSV).

Để áp dụng cho cây một lá mầm, các intron bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: intron hsp70 cây ngô, intron ubiquitin cây ngô, intron Adh 1, intron sucroza syntaza hoặc intron Act1 cây lúa. Để áp dụng cho cây hai lá mầm, các intron bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: intron CAT-1, intron pKANNIBAL, intron PIV2 và intron “siêu ubiquitin”.

Các trình tự kết thúc có thể là các trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thích hợp đóng một vai trò quan trọng đối với cây trồng và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen nopalín syntaza (NOS) của *Agrobacterium tumefaciens*, trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen ức chế trypsin II (pin II), trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen ssRUBISCO E9 của cây đậu và trình tự tín hiệu polyadenyl hóa thu được từ gen α -tubulin.

Thuật ngữ “liên kết hiệu quả” theo sáng chế có nghĩa là liên kết các trình tự axit nucleic. Việc liên kết cho phép trình tự tạo ra các chức năng cần cho trình tự được liên kết. “Liên kết hiệu quả” trong sáng chế có thể là liên kết giữa trình tự khởi đầu và trình tự quan tâm sao cho quá trình phiên mã trình tự quan tâm này được kiểm soát và được điều hòa bởi trình tự khởi đầu này. Khi trình tự quan tâm

mã hóa protein và sự biểu hiện protein cần có, thì “liên kết hiệu quả” có nghĩa là liên kết giữa trình tự khởi đầu và trình tự này. Kiểu liên kết này giúp cho các bản sao thu được được dịch mã hiệu quả. Nếu liên kết giữa trình tự khởi đầu và trình tự mã hóa là sự dung hợp của các bản sao và sự biểu hiện của protein được mã hóa muốn được nhận biết, thì tiến hành loại liên kết này, mà làm cho codon khởi đầu dịch mã thứ nhất trong các bản sao thu được là codon khởi đầu của trình tự mã hóa. Theo cách khác, nếu liên kết giữa trình tự khởi đầu và trình tự mã hóa là sự dung hợp dịch mã và sự biểu hiện của protein được mã hóa muốn được nhận biết, thì tiến hành kiểu liên kết này, mà làm cho codon khởi đầu dịch mã thứ nhất trong trình tự không dịch mã 5’ liên kết với trình tự khởi đầu, và kiểu liên kết này làm cho mối quan hệ giữa sản phẩm dịch mã thu được và ORF dịch mã mã hóa protein mong muốn thích ứng với khung đọc. Các trình tự axit nucleic mà có thể “được liên kết hiệu quả” bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: trình tự có chức năng biểu hiện gen (tức là: các yếu tố biểu hiện gen, như: trình tự khởi đầu, vùng không được dịch mã 5’, intron, vùng mã hóa protein, vùng không được dịch mã 3’, vị trí polyadenyl hóa và/hoặc trình tự kết thúc phiên mã), trình tự có chức năng chuyển và/hoặc kết hợp ADN (tức là: trình tự ranh giới T-ADN, vị trí nhận biết recombinaza đặc hiệu vị trí và vị trí nhận biết integraza), trình tự có chức năng chọn lọc (tức là: chỉ thị kháng kháng sinh và gen tổng hợp sinh học), trình tự có chức năng của chỉ thị đánh giá, trình tự hỗ trợ hoạt động của trình tự in vivo hoặc in vitro (tức là: trình tự nhiều nối, trình tự tái tổ hợp đặc hiệu vị trí) và trình tự có chức năng tái bản (tức là: trình tự khởi đầu tái bản ở vi khuẩn, trình tự sao chép tự trị và trình tự trung tâm).

Thuật ngữ “diệt côn trùng” hoặc “chống côn trùng” theo sáng chế có nghĩa là gây độc với các côn trùng của cây trồng, nhờ đó “kiểm soát được” và/hoặc “ngăn ngừa được” các côn trùng gây hại trên cây trồng. Tốt hơn là, thuật ngữ “diệt côn trùng” hoặc “chống côn trùng” được dùng để chỉ việc diệt các côn trùng gây hại trên cây trồng. Cụ thể là hơn là, côn trùng đích là côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

Protein Vip3A theo sáng chế là độc với côn trùng gây hại *Spodoptera litura*. Bộ gen của cây trồng theo sáng chế, cụ thể là cây đậu tương và cây ngô, chứa ADN ngoại sinh, mà chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3A. Côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein này nhờ ăn các mô cây trồng. Sau khi tiếp

xúc, sự phát triển của côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bị ức chế và cuối cùng dẫn đến chết. Ức chế được dùng để chỉ khả năng gây chết hoặc khả năng gây gần chết. Trong khi đó, cây trồng vẫn có hình thái bình thường và có thể được trồng bằng các phương pháp thông thường để được dùng để tiêu thụ và/hoặc tạo ra các sản phẩm. Hơn thế nữa, về cơ bản cây trồng có thể không cần sử dụng các thuốc trừ sâu hóa học hoặc sinh học (thuốc trừ sâu hóa học hoặc sinh học là các thuốc trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được nhắm tới bởi protein Vip3A).

Ở nguyên liệu thực vật, mức biểu hiện của protein trừ sâu có thể được phát hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, định lượng mRNA của protein trừ sâu được mã hóa được tạo ra trong các mô bằng cách sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu, hoặc phát hiện riêng và trực tiếp lượng protein trừ sâu được tạo ra.

Tác dụng trừ sâu của protein trừ sâu trong cây trồng có thể được xác định bằng cách áp dụng các thử nghiệm khác nhau. Các côn trùng đích trong sáng chế chủ yếu là *Spodoptera litura*.

Theo sáng chế, protein Vip3A có thể có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 và/hoặc SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự. Ngoài việc bao gồm vùng mã hóa của protein Vip3A, các yếu tố khác cũng có thể được bao gồm, như: các yếu tố mã hóa protein được đánh dấu chọn lọc.

Ngoài ra, catxet biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3A theo sáng chế cũng có thể được biểu hiện cùng với ít nhất là một gen mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ. Gen kháng thuốc diệt cỏ bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: gen kháng phosphinothrixin (như: gen bar và gen pat), gen kháng phenmedipham (như: gen pmph), gen kháng glyphosat (như: gen EPSPS), gen kháng bromoxynil, gen kháng sulfonylure, gen kháng thuốc diệt cỏ dalapon, gen kháng xyanamit hoặc gen kháng chất ức chế glutamin synthetaza (như: PPT), nhờ đó tạo ra cây chuyển gen có cả hoạt tính trừ sâu và khả năng kháng thuốc diệt cỏ cao.

Theo sáng chế, ADN ngoại sinh được đưa vào cây trồng. Ví dụ, gen hoặc catxet biểu hiện hoặc vector tái tổ hợp mã hóa protein Vip3A được đưa vào tế bào cây trồng. Phương pháp biến nạp thông thường bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: biến nạp qua trung gian *agrobacterium tumefaciens*, phương pháp bắn phá phát

xạ vết, phân hủy trực tiếp ADN trong tế bào trần, phương pháp xung điện hoặc biến nạp ADN qua trung gian sợi tinh thể silic oxit.

Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát côn trùng, mà có các ưu điểm sau:

1. Kiểm soát thông qua nguyên nhân bên trong: Giải pháp kỹ thuật đã biết kiểm soát sự gây hại của côn trùng *Spodoptera litura* chủ yếu thông qua tác động bên ngoài, tức là: nguyên nhân bên ngoài, ví dụ, kiểm soát nông nghiệp, kiểm soát hóa học và kiểm soát vật lý. Trong khi đó sáng chế kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bằng cách tạo ra protein Vip3A trong cây trồng mà có thể diệt *Spodoptera litura*, tức là: kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* thông qua nguyên nhân bên trong.
2. Không gây ô nhiễm không để lại dư lượng thuốc: phương pháp kiểm soát hóa học sử dụng trong giải pháp đã biết đóng một vai trò nhất định trong việc kiểm soát sự gây hại của côn trùng *Spodoptera litura*, nhưng đồng thời phương pháp này cũng gây ô nhiễm môi trường, phá hoại và để lại dư lượng thuốc gây hại đối với con người, vật nuôi và hệ sinh thái canh tác. Sử dụng phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được đề xuất bởi sáng chế có thể loại trừ được các hậu quả xấu nêu trên.
3. Kiểm soát toàn bộ giai đoạn phát triển: tất cả các phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được sử dụng trong giải pháp đã biết được áp dụng từng giai đoạn, trong khi đó sáng chế bảo vệ cây trồng qua tất cả giai đoạn phát triển để cho cây chuyển gen (protein Vip3A) có thể không cho *Spodoptera litura* xâm lấn vào giai đoạn nảy chồi, phát triển và kho đến khi nở hoa và ra quả.
4. Kiểm soát toàn bộ cây trồng: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được sử dụng trong giải pháp đã biết chủ yếu được áp dụng cục bộ, ví dụ phun lên tán lá, trong khi đó sáng chế bảo vệ được toàn bộ cây, ví dụ, lá, thân, cò, cụm hoa cái, bao phấn, chỉ nhị, quả và các bộ phận khác của cây chuyển gen (protein Vip3A) đều chống lại sự gây hại của *Spodoptera litura*.
5. Độ ổn định của tác dụng: Cả phương pháp kiểm soát nông nghiệp và phương pháp kiểm soát vật lý được sử dụng trong giải pháp đã biết đều cần sử dụng

các điều kiện môi trường để kiểm soát côn trùng gây hại và có nhiều yếu tố biến đổi. Sáng chế tạo ra protein Vip3A được biểu hiện trong cây trồng và nhờ vậy tránh được nhược điểm điều kiện môi trường không ổn định một cách hiệu quả. Hơn thế nữa, tác dụng kiểm soát của cây chuyển gen (Protein Vip3A) được đề xuất bởi sáng chế là ổn định và phù hợp với nhiều nơi khác nhau, thời điểm khác nhau, và tình trạng di truyền khác nhau.

6. Tính đơn giản, thuận tiện và kinh tế: Phương pháp kiểm soát vật lý trong giải pháp đã biết gặp các khó khăn nhất định đối với hoạt động sản xuất nông nghiệp, trong khi đó sáng chế chỉ cần trồng cây chuyển gen biểu hiện protein Vip3A và không cần tiến hành thêm các biện pháp nào khác, nhờ vậy tiết kiệm được một lượng lớn nhân công, nguyên liệu và chi phí.
7. Tác dụng triệt để: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* được sử dụng trong giải pháp đã biết không có tác dụng triệt để và chỉ đóng vai trò làm giảm bớt mức độ gây hại, trong khi đó cây chuyển gen (protein Vip3A) được đề xuất bởi sáng chế có thể gây chết hàng loạt ấu trùng mới nở của *Spodoptera litura* và ức chế đáng kể sự phát triển của ấu trùng còn sống với tỷ lệ nhỏ. 3 ngày sau đó, ấu trùng về cơ bản ở giai đoạn mới nở hoặc giai đoạn nằm giữa giai đoạn mới nở và kiểm soát bị động, tất cả đều bị phát triển dị dạng và đã ngừng phát triển. Cây chuyển gen phần lớn chỉ bị thiệt hại nhẹ.

Giải pháp kỹ thuật của phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại được đề xuất bởi sáng chế còn được mô tả dưới đây bằng cách đề xuất các ví dụ cụ thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thu nhận và tổng hợp gen Vip3A

1. Thu nhận trình tự nucleotit Vip3

Trình tự axit amin của protein trừ sâu Vip3Aa-01 (789 axit amin), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit Vip3Aa-01 mã hóa trình tự axit amin tương ứng (789 axit amin) của protein trừ sâu Vip3Aa-01 (2370 nucleotit), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự. Trình tự axit amin của protein trừ sâu Vip3Aa-02 (789 axit amin), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit Vip3Aa-02 mã hóa trình tự axit amin tương ứng (789 axit amin) của protein trừ sâu Vip3Aa-02 (2370 nucleotit),

được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự.

2. Thu nhận các trình tự nucleotit Cry 1A và Cry1F

Trình tự nucleotit Cry 1Ab mã hóa trình tự axit amin (818 axit amin) của protein trừ sâu Cry 1Ab (2457 nucleotit), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit Cry1Fa mã hóa trình tự axit amin (605 axit amin) của protein trừ sâu Cry1Fa (1818 nucleotit), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

3. Tổng hợp các trình tự nucleotit nêu trên

Trình tự nucleotit Vip3Aa-01 (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự), trình tự nucleotit Vip3Aa-02 (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự), trình tự nucleotit Cry 1Ab (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự) và trình tự nucleotit Cry1Fa (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự) được tổng hợp bởi GenScript (Nanjing) Co., Ltd.; đầu 5' của trình tự nucleotit Vip3Aa-01 được tổng hợp (SEQ ID NO: 3) cũng được liên kết với vị trí giới hạn ScaI, và đầu 3' của trình tự nucleotit Vip3Aa-01 (SEQ ID NO: 3) cũng được liên kết với vị trí giới hạn SpeI; đầu 5' của trình tự nucleotit được tổng hợp Vip3Aa-02 (SEQ ID NO: 4) cũng được liên kết với vị trí giới hạn ScaI, và đầu 3' của trình tự nucleotit Vip3Aa-02 (SEQ ID NO: 4) cũng được liên kết với vị trí giới hạn SpeI; đầu 5' của trình tự nucleotit được tổng hợp Cry 1Ab (SEQ ID NO: 5) cũng được liên kết với vị trí giới hạn NcoI, và đầu 3' của trình tự nucleotit Cry 1Ab (SEQ ID NO: 5) cũng được liên kết với vị trí giới hạn SpeI; đầu 5' của trình tự nucleoti được tổng hợp Cry1Fa (SEQ ID NO: 6) cũng được liên kết với vị trí giới hạn AscI, và đầu 3' của trình tự nucleoti Cry1Fa (SEQ ID NO: 6) cũng được liên kết với vị trí giới hạn BamHI.

Ví dụ 2: Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp và biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp vào agrobacteria

1. Tạo vector tách dòng tái tổ hợp chứa gen Vip3A

Trình tự nucleotit tổng hợp Vip3Aa-01 được gắn vào vector tách dòng pGEM-T (Promega, Madison, USA, CAT: A3600). Các bước thực hiện được tiến hành theo cẩm nang vector pGEM-T được cung cấp bởi Promega, để thu được vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T. Cấu trúc của vector này được thể hiện trong FIG.1

(trong đó, Amp viết tắt cho gen kháng ampicilin; f1 viết tắt cho điểm khởi đầu tái bản của thể thực khuẩn f1; LacZ viết tắt cho codon khởi đầu của LacZ; SP6 viết tắt cho trình tự khởi đầu ARN polymeraza SP6; T7 viết tắt cho trình tự khởi đầu ARN polymeraza T7; Vip3Aa-01 viết tắt cho trình tự nucleotit Vip3Aa-01 (SEQ ID NO: 3); MCS viết tắt cho vị trí đa tách dòng).

Sau đó vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T được sử dụng để biến nạp vào các tế bào khả biến *Escherichia coli* T1 (Transgen, Beijing, China, CAT: CD501) bằng phương pháp sốc nhiệt. Các điều kiện sốc nhiệt là: giữ 50µl tế bào khả biến *Escherichia coli* T1 và 10µl ADN plasmit (vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T) trong bể nước 42°C trong 30 giây; lắc và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong một giờ (lắc trên bàn lắc ở tốc độ 100 vòng/phút), và để phát triển qua đêm trên đĩa LB chứa ampicilin (100mg/L) (trypton 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L, NaCl 10g/L và thạch 15g/L; điều chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH) phủ IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactozit) và X-gal (5-bromin-4-clo-3-indol-β-D-galactozit) trên bề mặt. Lấy các khuẩn lạc màu trắng ra, và nuôi cấy chúng qua đêm trong môi trường nuôi cấy lỏng LB (trypton 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L, NaCl 10g/L và ampicilin 100mg/L; điều chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH) ở nhiệt độ 37°C. Chiết plasmit của nó bằng phương pháp kiểm: ly tâm dung dịch vi khuẩn ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 1 phút, loại bỏ dịch nổi, tạo huyền phù phần lắng bằng 100µl dung dịch I đã làm lạnh sơ bộ bằng đá (Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM (Axit Etylen Diamin Tetraaxetic), glucoza 50mM, pH 8,0); bổ sung 150µl dung dịch II mới điều chế (NaOH 0,2M, SDS 1% (lauryl natri sulfat)), lắc ống này lên xuống 4 lần, trộn chúng và đặt hỗn hợp này trên đá trong 3-5 phút; bổ sung 150µl dung dịch III đã làm lạnh trên đá (kali axetat 4M, axit axetic 2M), trộn chúng kỹ ngay, đặt dung dịch thu được trên đá trong 5-10 phút; ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút, bổ sung rượu etylic tuyệt đối với thể tích gấp hai lần vào dịch nổi, trộn kỹ chúng, và sau đó giữ dung dịch thu được ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút; ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút, loại dịch nổi, rửa phần lắng bằng etanol 70% (thể tích/thể tích) và sau đó làm khô trong không khí; bổ sung 30µl TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) chứa RNaza (20µg/ml) để hòa tan phần lắng; giữ trong bể nước 37°C trong 30 phút, và phân cắt ARN; giữ ở nhiệt độ -

20°C để sử dụng sau.

Sau đó plasmit đã chiết được phân cắt và được xác định bằng EcoRV và SphI, dòng dương tính được đánh giá bằng cách giải trình tự. Kết quả giải trình tự chỉ ra rằng trình tự nucleotit Vip3Aa-01 được cài trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T là trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Vip3Aa-01 được cài chính xác.

Theo phương pháp tạo vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit tổng hợp Vip3Aa-02 được gắn vào vector tách dòng pGEM-T để thu được vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T, trong đó Vip3Aa-02 là trình tự nucleotit Vip3Aa-02 (SEQ ID NO: 4). Phân cắt bằng enzym và giải trình tự chỉ ra rằng trình tự nucleotit Vip3Aa-02 trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T được cài chính xác.

Theo phương pháp tạo vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Ab tổng hợp được gắn vào vector tách dòng pGEM-T để thu được vector tách dòng tái tổ hợp DBN03-T, trong đó Cry 1Ab là trình tự nucleotit Cry 1Ab (SEQ ID NO: 5). Phân cắt bằng enzym và giải trình tự chỉ ra rằng trình tự nucleotit Cry 1Ab trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN03-T được cài chính xác.

Theo phương pháp tạo vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit được tổng hợp Vip3A được gắn vào vector tách dòng pGEM-T để thu được vector tách dòng tái tổ hợp DBN04-T, trong đó Cry1Fa là trình tự nucleotit Cry1Fa (SEQ ID NO: 6). Phân cắt bằng enzym và giải trình tự chỉ ra rằng trình tự nucleotit Cry1Fa trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN04-T được cài chính xác.

2. Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp chứa gen Vip3A

Enzym giới hạn endonucleaza ScaI và SpeI được sử dụng để phân cắt vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-01 (khung vector: pCAMBIA2301 (có thể được cung cấp bởi tổ chức CAMBIA)) tương ứng. Các đoạn cắt của trình tự nucleotit Vip3Aa-01 được cài vào các vị trí giữa ScaI và SpeI của vector biểu hiện DBNBC-01. Việc áp dụng phương pháp phân cắt thông thường để tạo ra vector là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066. Cấu trúc của vector này được thể hiện trong FIG.2 (Kan: gen kanamycin; RB: ranh giới phải; Ubi: trình tự khởi

đầu của gen ubiquitin ở cây ngô (SEQ ID NO: 7); Vip3Aa-01; trình tự nucleotit Vip3Aa-01 (SEQ ID NO: 3); Nos: trình tự kết thúc của gen nopal synthase (SEQ ID NO: 8); PMI: gen phosphomannose isomerase (SEQ ID NO: 9); LB: ranh giới trái).

Vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066 được sử dụng để biến nạp vào tế bào khả biến *Escherichia coli* T1 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các điều kiện sốc nhiệt là: giữ 50µl tế bào khả biến *Escherichia coli* T1 và 10µl ADN plasmid (vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066) trong bể nước 42°C trong 30 giây; lắc và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ (lắc trên bàn lắc ở tốc độ 100 vòng/phút); sau đó nuôi cấy trên đĩa LB rắn (trypton 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L, NaCl 10g/L, thạch 15g/L; điều chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH) chứa kanamycin 50mg/L ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ, lấy các khuẩn lạc màu trắng, và nuôi cấy chúng qua đêm trong môi trường lỏng LB (trypton 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L, NaCl 10g/L và kanamycin 50mg/L; điều chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH) ở nhiệt độ 37°C; chiết plasmid của nó bằng phương pháp kiềm. Phân cắt plasmid đã chiết bằng enzym giới hạn endonuclease ScaI và SpeI và sau đó xác định, giải trình tự và nhận dạng các dòng dương tính. Kết quả cho thấy rằng trình tự nucleotit của vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066 giữa các vị trí ScaI và SpeI là trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Vip3Aa-01.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066 nêu trên, trình tự nucleotit Vip3Aa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab cắt ra từ các vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN03-T được phân cắt bởi ScaI và SpeI, NcoI và SpeI được cài vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100003. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100003 chứa các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Vip3Aa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab, mà có thể gắn với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066 nêu trên, trình tự nucleotit Vip3Aa-02 và trình tự nucleotit Cry1Fa cắt từ các vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T và DBN04-T được phân cắt bởi ScaI và SpeI, AscI và BamHI được

cài vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276 chứa các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Vip3Aa-02 và trình tự nucleotit Cry1Fa, có thể gắn trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066 nêu trên, enzym giới hạn endonucleaza ScaI và SpeI được sử dụng để phân cắt vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-02 (khung vector: pCAMBIA2301 (có thể được cung cấp bởi tổ chức CAMBIA)) tương ứng. Các đoạn cắt của trình tự nucleotit Vip3Aa-01 được cài vào các vị trí giữa ScaI và SpeI của vector biểu hiện DBNBC-02. Sử dụng phương pháp phân cắt thông thường để tạo ra vector là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100002. Cấu trúc của vector này được thể hiện trong FIG.3 (Kan: gen kanamycin; RB: ranh giới phải; Ubi: trình tự khởi đầu của gen Ubiquitin ở cây ngô (SEQ ID NO: 7); Vip3Aa-01: trình tự nucleotit Vip3Aa-01 (SEQ ID NO: 3); Nos: trình tự kết thúc của gen nopal synthase (SEQ ID NO: 8); PAT: gen glufosinat acetyltransferase (SEQ ID NO: 22); LB: ranh giới trái).

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100002 nêu trên, trình tự nucleotit Vip3Aa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab cắt từ vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN03-T được phân cắt bởi ScaI và SpeI, NcoI và BamHI được cài vào vector biểu hiện DBNBC-02 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100321. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100321 bao gồm các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Vip3Aa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab, có thể gắn với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100002 nêu trên, trình tự nucleotit Vip3Aa-02 và trình tự nucleotit Cry1Fa cắt từ vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T và DBN04-T được phân cắt bởi ScaI và SpeI, AscI và BamHI được cài vào vector biểu hiện DBNBC-02 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp

DBN100013. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100013 bao gồm các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Vip3Aa-02 và trình tự nucleotit Cry1Fa, có thể gắn với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

3. Biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp vào agrobacteria

Các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066, DBN100003, DBN100276, DBN100002, DBN100321 và DBN100013 được tạo ra chính xác được biến nạp vào agrobacteria LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT: 18313-015) bằng phương pháp nitor lỏng. Các điều kiện biến nạp là: đặt 100µL agrobacteria LBA4404 và 3µL ADN plasmit (vector biểu hiện tái tổ hợp) trong nitor lỏng trong 10 phút, và bể nước ấm 37°C trong 10 phút; nuôi cấy agrobacteria LBA4404 đã biến nạp trong ống thử nghiệm LB, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ, phủ dung dịch nuôi cấy lên đĩa LB chứa Rifampixin 50mg/L và Kanamycin 100mg/L cho đến khi đơn dòng dương tính phát triển, lấy đơn dòng để nuôi cấy và chiết plasmit, sau đó sử dụng các enzym giới hạn endonucleaza StyI và AatII để phân cắt vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066, DBN100003, DBN100276, DBN100002, DBN100321 và DBN100013, sau đó đánh giá việc phân cắt. Kết quả phân cắt chỉ ra rằng cấu trúc của vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066, DBN100003, DBN100276, DBN100002, DBN100321 và DBN100013 là chính xác hoàn toàn.

Ví dụ 3: Tạo ra và đánh giá cây ngô được biến nạp gen Vip3A

1. Tạo ra cây ngô được biến nạp gen Vip3A

Theo phương pháp nhiễm agrobacteria thông thường, các phôi non được nuôi cấy vô trùng của giống ngô Zong31 (Z31) và agrobacteria trong mục 3 của Ví dụ 2 được đồng nuôi cấy để chuyển T-ADN (bao gồm trình tự khởi đầu của gen Ubiquitin ở cây ngô, trình tự nucleotit Vip3Aa-01, trình tự nucleotit Vip3Aa-02, trình tự nucleotit Cry 1Ab, trình tự nucleotit Cry1Fa, gen PMI và trình tự kết thúc Nos) trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100066, DBN100003 và DBN100276 được tạo ra theo mục 2 của ví dụ 2 vào bộ nhiễm sắc thể cây ngô và thu được cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit

Vip3Aa-01-Cry1Ab, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa. Đồng thời sử dụng các cây ngô kiểu dại làm đối chứng.

Đối với sự biến nạp cây ngô qua trung gian agrobacterium, nói một cách đơn giản là, tách các phôi non chưa trưởng thành khỏi cây ngô và cho các phôi non tiếp xúc với huyền phù agrobacteria, trong đó agrobacteria có thể chuyển trình tự nucleotit Vip3Aa-01, trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và/hoặc trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa vào ít nhất là một tế bào của một trong số các phôi (bước 1: bước lây nhiễm). Trong bước này, tốt hơn là các phôi non lây nhiễm trong huyền phù agrobacteria ($OD_{660}=0,4-0,6$, môi trường lây nhiễm (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 68,5g/L, glucoza 36g/L, axetosyringon (AS) 40mg/L, axit 2,4-diclohenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, pH5,3)) để bắt đầu lây nhiễm. Các phôi non và agrobacteria được đồng nuôi cấy trong một khoảng thời gian (3 ngày) (bước 2: bước đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, sau bước lây nhiễm, các phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 20g/L, glucoza 10g/L, axetosyringon (AS) 100mg/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, thạch 8g/L, pH 5,8); sau giai đoạn đồng nuôi cấy này, có thể tiến hành bước “thu hồi” chọn lọc. Trong bước “thu hồi”, môi trường thu hồi (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 30g/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, thạch 8g/L, pH=5,8) chứa ít nhất là một kháng sinh (cephalosporin) được biết đến là ức chế sự phát triển của agrobacteria, và không bổ sung chất chọn lọc cây biến nạp (bước 3: bước thu hồi). Tốt hơn là, các phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn chứa kháng sinh, nhưng không chứa chất chọn lọc, để loại agrobacteria và tạo ra giai đoạn thu hồi các tế bào đã bị nhiễm. Sau đó, các phôi non đã bị nhiễm được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa chất chọn lọc (manozax) và chọn lọc mô sẹo đã biến nạp phát triển (bước 4: bước chọn lọc). Tốt hơn là, các phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn sàng lọc chứa chất chọn lọc (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 5g/L, manozax 12,5g/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, thạch 8g/L, pH5,8), dẫn đến sự phát triển chọn lọc của các tế bào đã biến nạp. Sau đó, mô sẹo được tái sinh thành cây (bước 5: bước tái sinh). Tốt hơn là, mô sẹo phát triển trên môi trường chứa chất chọn lọc được nuôi cấy trên môi trường rắn (môi trường phân

hóa MS và môi trường sinh rễ MS) để tái sinh cây.

Mô sẹo kháng thu được từ quá trình sàng lọc được chuyển vào môi trường phân hóa MS (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 30g/L, 6-benzyladenin 2mg/L, mannoza 5g/L, thạch 8gm, pH5,8), và nuôi cấy để phân hóa ở nhiệt độ 25°C. Các cây con thu được từ quá trình phân hóa được chuyển sang môi trường sinh rễ MS (muối MS 2,15g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 30g/L, axit indol-3-axetic 1mg/L, thạch 8g/L, pH5,8), và nuôi cấy ở nhiệt độ 25°C cho đến khi đạt tới chiều cao bằng 10cm, thì chuyển sang nhà kính và trồng cho đến khi ra quả. Trong nhà kính, các cây con được trồng ở nhiệt độ 28°C trong 16 giờ và sau đó ở nhiệt độ 20°C trong 8 giờ mỗi ngày.

2. Sử dụng TaqMan để đánh giá cây ngô đã biến nạp gen Vip3A

100mg lá được lấy từ cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa tương ứng làm các mẫu. ADN bộ gen của chúng được chiết bằng kit Qiagen DNeasy Plant Maxi. Số bản sao của gen Vip3A, gen Cry1A và gen Cry1F được phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang sử dụng mẫu dò Taqman. Trong khi đó, các cây ngô kiểu dại được sử dụng làm đối chứng. Việc phát hiện và phân tích được tiến hành theo phương pháp trên. Thử nghiệm này được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình của chúng.

Số bản sao của gen Vip3A, gen Cry1A và gen Cry1F được phát hiện bằng phương pháp sau:

Bước 11: 100mg lá của cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa và cây ngô kiểu dại tương ứng, nghiền chúng bằng nitor lỏng thành dung dịch đồng nhất trong cối tương ứng, và tiến hành bước trên ba lần đối với mỗi mẫu.

Bước 12: Sử dụng kit Qiagen DNeasy Plant Mini để chiết ADN bộ gen của các mẫu trên. Đối với phương pháp cụ thể, xin xem sách hướng dẫn của chúng.

Bước 13: Sử dụng NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) để xác định nồng độ ADN bộ gen trong các mẫu nêu trên.

Bước 14: Điều chỉnh nồng độ ADN bộ gen của các mẫu nêu trên đến cùng một

giá trị nồng độ. Khoảng giá trị nồng độ là 80-100ng/μl;

Bước 15: Xác định số bản sao của mỗi mẫu bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang nhờ mẫu dò Taqman, sử dụng các mẫu đã xác định với số bản sao đã biết làm các chất chuẩn, và các mẫu của cây ngô kiều đại làm đối chứng. Thực hiện bước trên ba lần đối với mỗi mẫu và lấy giá trị trung bình. Các trình tự của các đoạn mồi và mẫu dò dùng trong phản ứng PCR định lượng huỳnh quang là:

Các đoạn mồi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Vip3Aa-01:

Đoạn mồi 1 (VF1): ATTCTCGAAATCTCCCCTAGCG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự;

Đoạn mồi 2 (VR1): GCTGCCAGTGGATGTCCAG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 11 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 1 (VP1): CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAACACC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 12 trong danh mục trình tự;

Các đoạn mồi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Vip3Aa-02:

Đoạn mồi 3 (VF2): ATTCTCGAAATCTCCCCTAGCG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 13 trong danh mục trình tự;

Đoạn mồi 4 (VR2): GCTGCCAGTGGATGTCCAG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 2 (VP2): CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAACACC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự;

Các đoạn mồi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry1Ab:

Đoạn mồi 5 (CF1): CGAACTACGACTCCCGCAC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự;

Đoạn mồi 6 (CR1): GTAGATTTCGCGGGTCAGTTG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 3 (CP1): CTACCCGATCCGCACCGTGTCC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự;

Các đoạn mồi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit

Cry1Fa:

Đoạn mồi 7 (CF2): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự;

Đoạn mồi 8 (CR2): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 4 (CP2): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự;

Hệ phản ứng PCR:

Jump Start™ Taq Ready Mix™ (Sigma)	10µl
Hỗn hợp 50×đoạn mồi/mẫu dò	1µl
ADN bộ gen	3µl
Nước (ddH ₂ O)	6µl

Hỗn hợp 50×đoạn mồi/mẫu dò chứa 45µl mỗi đoạn mồi ở nồng độ bằng 1mM, 50µl mẫu dò 100µM và 860µl dung dịch đệm 1×TE và được bảo quản trong ống thí nghiệm màu hổ phách ở nhiệt độ 4°C.

Các điều kiện của phản ứng PCR:

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

Phân tích số liệu bằng cách sử dụng phần mềm SDS2.3 (Applied Biosystems).

Các kết quả thử nghiệm chỉ ra rằng trình tự nucleotit Vip3Aa-01, trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đều được đưa vào bộ nhiễm sắc thể của cây ngô được phát hiện, và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đều thu được cây ngô chuyển gen chứa một bản sao của gen Vip3A, gen Cry1A và/hoặc gen Cry1F.

Ví dụ 4: Phát hiện tác dụng trừ sâu của cây ngô chuyển gen

Phát hiện tác dụng trừ sâu chống lại *Spodoptera litura* của cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-

01-Cry1Ab, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, cây ngô kiểu dại và cây ngô không chuyển gen như được xác định bằng Taqman.

Các lá mới (lá ở phía trong) được lấy từ cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, cây ngô kiểu dại và cây ngô không chuyển gen như được xác định bằng Taqman (các giai đoạn V3-V4) tương ứng và rửa bằng nước vô trùng. Nước trên lá được thấm khô bằng gạc. Sau đó các gân của lá cây ngô được loại bỏ và lá được cắt thành các dải dài có kích thước 1cm×4cm. Hai dải lá được đặt trên giấy lọc ở đáy của đĩa nuôi cấy bằng nhựa hình tròn. Giấy lọc được làm ẩm bằng nước cất. 10 con côn trùng *Spodoptera lituras* được nuôi nhân tạo (ấu trùng mới nở) được đặt vào mỗi đĩa nuôi cấy. Các đĩa nuôi cấy có côn trùng được đậy lại và sau đó được đặt vào trong hộp vuông có gạc ẩm ở đáy hộp và để yên trong 3 ngày trong các điều kiện 26-28°C, độ ẩm tương đối 70%-80% và giai đoạn quang kỳ (sáng/tối) 16:8. Dựa trên ba chỉ số: quá trình phát triển và tỷ lệ chết của ấu trùng *Spodoptera litura* và tỷ lệ phá hoại lá, thu được tổng số điểm kháng: Tổng số điểm kháng=100×tỷ lệ chết+[100×tỷ lệ chết+90×(số ấu trùng mới nở/tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm)+60×(số ấu trùng mới nở – số côn trùng trong đối chứng âm/tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm)+10×(số côn trùng trong đối chứng âm/tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm)]+100×(1-tỷ lệ phá hoại lá). Có ba giống (S1, S2 và S3) được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, 3 giống (S4, S5 và S6) được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, 3 giống (S7, S8 và S9) được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, một giống được xác định bởi Taqman là không chuyển gen (NGM1) và giống kiểu dại (CK1); ba cây được chọn từ mỗi giống để tiến hành thí nghiệm và mỗi cây được thí nghiệm sáu lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1 và FIG.4.

Bảng 1 Các kết quả của các thử nghiệm trừ sâu ở cây ngô chuyển gen được nhiễm *Spodoptera litura*

Cây trồng	Tỷ lệ phá hoại lá (%)	Quá trình phát triển <i>Spodoptera litura</i> (một giống)			Tình trạng chết của <i>Spodoptera litura</i> (một giống)		Tổng số điểm (một giống)	Tổng số điểm trung bình
		Mới nở	Mới nở – đối chứng âm	≥Đối chứng âm	Tổng số ấu trùng dùng lây	Tỷ lệ chết (%)		

		nhiễm						
S1	0	0	0	0	10	100	300	
S2	0	0	0	0	10	100	300	300
S3	0	0	0	0	10	100	300	
S4	0	0	0	0	10	100	300	
S5	0	0	0	0	10	100	300	300
S6	0	0	0	0	10	100	300	
S7	0	0	0	0	10	100	300	
S8	0	0	0	0	10	100	300	300
S9	0	0	0	0	10	100	300	
NGM1	100	0	2	8	10	0	20	20
CK1	100	0	0	10	10	0	10	10

Các kết quả trong bảng 1 chỉ ra rằng: tổng số điểm của cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa trong thử nghiệm sinh học đều đạt được số điểm tối đa là 300 điểm; trong khi đó tổng số điểm của cây ngô không chuyển gen được xác định bởi Taqman và cây ngô kiểu dại trong thử nghiệm sinh học nói chung đều đạt được điểm số quanh 15 điểm.

Các kết quả trong FIG.4 chỉ ra rằng: so với cây ngô kiểu dại, các tác dụng kiểm soát trên ấu trùng mới nở ở cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa là gần 100%, và lá của cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa hầu như không bị phá hoại.

Do đó, đã chứng minh được rằng cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đều có hoạt tính cao chống lại *Spodoptera litura* và hoạt tính này đủ để tạo ra tác dụng có hại đối với sự phát triển của *Spodoptera litura*, để kiểm soát loài côn trùng này.

Ví dụ 5: Tạo ra và đánh giá cây đậu tương được biến nạp gen Vip3A

1. Tạo ra cây đậu tương được biến nạp gen Vip3A

Theo phương pháp lây nhiễm thông qua vi khuẩn agrobacteria thông thường, các mô nốt lá mầm được nuôi cấy vô trùng của giống cây đậu tương

ZHONGHUANG 13 và vi khuẩn *agrobacteria* trong mục 3 của ví dụ 2 được đồng nuôi cấy để chuyển T-ADN (bao gồm trình tự khởi đầu của gen Ubiquitin ở cây ngô, trình tự nucleotit Vip3Aa-01, trình tự nucleotit Vip3Aa-02, trình tự nucleotit Cry 1Ab, trình tự nucleotit Cry1Fa, gen PAT và trình tự kết thúc Nos) trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100002, DBN100321 và DBN100013 được tạo ra theo mục 2 của ví dụ 2 vào bộ nhiễm sắc thể của cây đậu tương và tạo ra cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa. Đồng thời sử dụng cây đậu tương kiểu dại làm đối chứng.

Đối với sự biến nạp cây đậu tương qua trung gian *agrobacterium*, nói một cách đơn giản là, ươm hạt đậu tương trưởng thành trên môi trường ươm cây đậu tương (muối B5 3,1g/L, vitamin B5, sucroza 20g/L, thạch 8g/L, pH=5,6), gây nhiễm hạt trên môi trường ươm và trồng chúng trong các điều kiện dưới đây: nhiệt độ $25\pm 1^{\circ}\text{C}$; quang kỳ (sáng/tối) 16/8 giờ. Sau khi ươm 4 đến 6 ngày, chọn các cây giống con đậu tương căng vô trùng ở các nốt lá mầm xanh tươi và cắt thân lá mầm thấp từ vị trí dưới nốt lá mầm 3 đến 4mm, lá mầm được cắt mở theo chiều dọc và chồi ngọn, chồi bên và rễ hạt được loại bỏ. Dùng dao rạch nốt lá mầm. Cho huyền phù vi khuẩn *agrobacteria* tiếp xúc với các mô nốt lá mầm đã rạch. Vi khuẩn *agrobacteria* có khả năng chuyển các trình tự sang các mô nốt lá mầm đã rạch (bước 1: bước nhiễm). Ở bước này, tốt hơn nếu các mô nốt lá mầm được ngâm vào trong huyền phù vi khuẩn *agrobacteria* ($\text{OD}_{660}=0,5-0,8$, môi trường lây nhiễm (muối MS 2,15g/L, vitamin B5, sucroza 20g/L, glucoza 10g/L, axetosyringon (AS) 40mg/L, axit 2-morpholinetansulfonic (MES) 4g/L, zeatin (ZT) 2mg/L, pH5,3) để bắt đầu lây nhiễm. Các mô nốt lá mầm và vi khuẩn *agrobacteria* được đồng nuôi cấy trong một khoảng thời gian (3 ngày) (bước 2: bước đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, sau bước lây nhiễm này, mô nốt lá mầm được nuôi cấy trên môi trường rắn (muối MS 4,3g/L, vitamin B5, sucroza 20g/L, glucoza 10g/L, axit 2-morpholinetansulfonic (MES) 4g/L, zeatin 2mg/L, thạch 8g/L, pH5,6). Sau giai đoạn đồng nuôi cấy này, có thể tiến hành bước “thu hồi” chọn lọc. Ở bước “thu hồi”, môi trường thu hồi (muối B5 3,1g/L, vitamin B5, axit 2-morpholinetansulfonic (MES) 1g/L, sucroza 30g/L, zeatin (ZT) 2mg/L, thạch 8g/L, cephalosporin 150mg/L, axit glutamic 100mg/L,

axit aspartic 100mg/L, pH5,6) chứa ít nhất là một kháng sinh (cephalosporin) được biết đến là ức chế sự phát triển của vi khuẩn agrobacteria, và không bổ sung chất chọn lọc cây trồng biến nạp (bước 3: bước thu hồi). Tốt hơn nếu, các khối mô được tái sinh bằng nốt lá mầm được nuôi cấy trên môi trường rắn chứa kháng sinh, nhưng không chứa chất chọn lọc, để loại bỏ vi khuẩn agrobacteria và tạo ra giai đoạn thu hồi các tế bào bị nhiễm. Sau đó, các khối mô được tái sinh bằng nốt lá mầm được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy chứa chất chọn lọc (phosphinothrixin) và chọn mô sẹo đã biến nạp phát triển (bước 4: bước chọn lọc). Tốt hơn là, các khối mô được tái sinh bằng nốt lá mầm được nuôi cấy trên môi trường rắn sàng lọc chứa chất chọn lọc (muối B5 3,1g/L, vitamin B5, axit 2-morpholinetansulfonic (MES) 1g/L, sucroza 30g/L, 6-benzyladenin (6-BAP) 1mg/L, thạch 8g/L, cephalosporin 150mg/L, axit glutamic 100mg/L, axit aspartic 100mg/L, phosphinothrixin 6mg/L, pH5,6), dẫn đến sự phát triển chọn lọc của các tế bào được biến nạp. Sau đó, các tế bào đã biến nạp được tái sinh thành cây (bước 5: bước tái sinh). Tốt hơn là, các khối mô được tái sinh bằng nốt lá mầm được phát triển trên môi trường nuôi cấy chứa chất chọn lọc được nuôi cấy trên môi trường rắn (môi trường phân hóa B5 và môi trường nuôi cấy tạo rễ B5) để tái sinh cây.

Các khối mô kháng thu được từ quá trình sàng lọc được chuyển sang môi trường phân hóa B5 (muối B5 3,1g/L, vitamin B5, axit 2-morpholinetansulfonic (MES) 1g/L, sucroza 30g/L, zeatin (ZT) 1mg/L, thạch 8g/L, cephalosporin 150mg/L, axit glutamic 50mg/L, axit aspartic 50mg/L, gibberellin 1mg/L, auxin 1mg/L, phosphinothrixin 6mg/L, pH5,6) và nuôi cấy chúng để phân hóa ở nhiệt độ 25°C. Các cây giống con thu được từ quá trình phân hóa được chuyển sang môi trường nuôi cấy tạo rễ B5 (muối B5 3,1g/L, vitamin B5, axit 2-morpholinetansulfonic (MES) 1g/L, sucroza 30g/L, thạch 8g/L, cephalosporin 150mg/L, axit indol-3-butyric (IBA) 1mg/L), và nuôi cấy trên môi trường tạo rễ ở nhiệt độ 25°C cho đến khi cây cao được 10cm, sau đó chuyển sang nhà kính và trồng cho đến khi ra quả. Trong nhà kính, chúng được trồng ở nhiệt độ 26°C trong 16 giờ và sau đó trồng ở nhiệt độ 20°C trong 8 giờ mỗi ngày.

2. Sử dụng TaqMan để đánh giá cây đậu tương được biến nạp gen Vip3A

100mg lá được lấy từ cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-

01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự Vip3Aa-02-Cry1Fa tương ứng làm các mẫu. ADN bộ gen của chúng được chiết bằng kit Qiagen DNeasy Plant Maxi. Số bản sao của gen Vip3A, gen Cry1A và gen Cry1F được phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang sử dụng mẫu dò Taqman. Trong khi đó, cây đậu tương kiểu dại được sử dụng làm đối chứng. Phát hiện và phân tích được tiến hành theo phương pháp nêu trên sử dụng TaqMan để đánh giá cây ngô được biến nạp gen Vip3A ở mục 2 của ví dụ 3. Thử nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình của chúng.

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng trình tự nucleotit Vip3Aa-01, trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1A và trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đều được đưa vào bộ nhiễm sắc thể của cây đậu tương được phát hiện, và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đều thu được cây đậu tương chuyển gen chứa một bản sao của gen Vip3A, gen Cry1A và/hoặc gen Cry1F.

Ví dụ 6: Phát hiện tác dụng trừ sâu của cây đậu tương chuyển gen

Phát hiện tác dụng trừ sâu chống lại *Spodoptera litura* của cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, cây đậu tương kiểu dại và cây đậu tương không chuyển gen như được xác định bởi Taqman.

Lá mới được lấy ra từ cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, cây đậu tương kiểu dại và cây đậu tương không chuyển gen như được xác định bởi Taqman (giai đoạn ba lá) tương ứng và rửa bằng nước vô trùng. Nước trên lá được thấm khô bằng gạc. Sau đó lá được cắt thành hình vuông có kích thước 2cm×2cm. Lá có hình vuông đã cắt được đặt trên giấy lọc ở đáy của đĩa nuôi cấy bằng nhựa hình tròn. Giấy lọc được làm ẩm bằng nước vô trùng. 10 con côn trùng gây hại *Pest Spodoptera lituras* được nuôi nhân tạo (ấu trùng mới nở) được đặt vào mỗi đĩa nuôi cấy. Các đĩa nuôi

cây có côn trùng được đẩy và sau đó được đặt vào hộp hình vuông có gác ẩm ở đáy hộp và để trong 3 ngày trong các điều kiện 26-28°C, RH 70%-80% và quang kỳ (sáng/tối) 16:8. Dựa trên ba chỉ số: quá trình phát triển và tỷ lệ chết của ấu trùng *Spodoptera litura* và tỷ lệ phá hoại lá, thu được tổng số điểm kháng: tổng số điểm = $100 \times \text{tỷ lệ chết} + [100 \times \text{tỷ lệ chết} + 90 \times (\text{số ấu trùng mới nở} / \text{tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm}) + 60 \times (\text{số ấu trùng mới nở} - \text{số côn trùng ở đối chứng âm} / \text{tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm}) + 10 \times (\text{số côn trùng ở nhóm đối chứng âm} / \text{tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm})] + 100 \times (1 - \text{tỷ lệ phá hoại lá})$. Có ba giống (S10, S11 và S12) được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, 3 giống (S13, S14 và S15) được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, 3 giống (S16, S17 và S18) được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, giống được xác định bởi Taqman là không chuyển gen (NGM2) và giống kiểu đại (CK2); ba cây được chọn từ mỗi giống để tiến hành thử nghiệm và mỗi cây được thử sáu lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2 và FIG.5.

Bảng 2 Các kết quả của các thử nghiệm trừ sâu trên cây đậu tương chuyển gen được nhiễm *Spodoptera litura*

Cây trồng	Tỷ lệ phá hoại lá (%)	Quá trình phát triển của <i>Spodoptera litura</i> (một giống)			Trường hợp chết của <i>Spodoptera litura</i> (một giống)		Tổng số điểm (một giống)	Tổng số điểm trung bình
		Mới nở	Mới nở – Đối chứng âm	≥ đối chứng âm	Tổng số ấu trùng dùng để nhiễm	Tỷ lệ chết (%)		
S10	2	0,7	0	0	10	93	290	292
S11	1,7	0,7	0	0	10	93	291	
S12	1,7	0,3	0	0	10	97	295	
S13	0	0	0	0	10	100	300	300
S14	0	0	0	0	10	100	300	
S15	0	0	0	0	10	100	300	
S16	0	0	0	0	10	100	300	300
S17	0	0	0	0	10	100	300	
S18	0	0	0	0	10	100	300	
NGM2	70	0	2	8	10	0	50	50
CK2	65	0	0	10	10	0	45	45

Các kết quả trong bảng 2 chỉ ra rằng: tổng điểm của cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit

Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa trong thử nghiệm sinh học đều đạt được điểm số tối đa quanh 300 điểm; trong khi đó, tổng điểm của cây đậu tương không chuyển gen được xác định bởi Taqman và cây đậu tương kiểu dại trong thử nghiệm sinh học này nói chung là đạt được điểm số quanh 50 điểm.

Các kết quả trong FIG.5 chỉ ra rằng: so với cây đậu tương kiểu dại, tác dụng kiểm soát của cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đối với ấu trùng mới nở là gần 100%. Ấu trùng sống sót được với một tỷ lệ cực kỳ nhỏ về cơ bản sẽ ngừng phát triển, và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa chỉ bị phá hoại nhẹ bởi ấu trùng, lá chỉ bị phá hoại nhẹ dạng lỗ rất nhỏ, tỷ lệ phá hoại lá của chúng đều bằng hoặc dưới 3%.

Do đó, đã chứng minh được rằng cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa đều có hoạt tính cao chống lại *Spodoptera litura* và hoạt tính này đủ để tạo ra tác dụng có hại đến sự phát triển của *Spodoptera litura*, để kiểm soát nó.

Các kết quả thử nghiệm trên đây cũng chỉ ra rằng cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-01-Cry1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Vip3Aa-02-Cry1Fa có thể kiểm soát *Spodoptera litura* rõ ràng do bản thân chúng có thể tạo ra protein Vip3A. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng dựa trên tác dụng gây độc này của protein Vip3A đối với *Spodoptera litura*, cây chuyển gen có thể tạo ra protein Vip3A biểu hiện tương tự có thể được sử dụng để kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura*. Protein Vip3A theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự axit amin nhất định của protein Vip3A theo các phương án. Trong khi đó, cây chuyển gen cũng có thể tạo ra

ít nhất là một protein trừ sâu loại thứ hai khác biệt với protein Vip3A, như: protein Cry1A, protein Cry1F và protein Cry1B.

Tóm lại, phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* nhờ tạo ra protein Cry 1F bên trong cây trồng có thể diệt *Spodoptera litura*. So với phương pháp kiểm soát nông nghiệp, phương pháp kiểm soát hóa học và phương pháp kiểm soát vật lý sử dụng trong giải pháp đã biết, sáng chế bảo hộ toàn bộ cây trồng qua tất cả giai đoạn phát triển để kiểm soát sự lan tràn của côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, và phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế không gây ô nhiễm và không để lại dư lượng thuốc, tác dụng này ổn định và triệt để và đơn giản, thuận tiện và kinh tế.

Cuối cùng cần lưu ý rằng các ví dụ trên đây được dự định để mô tả giải pháp kỹ thuật của sáng chế mà không giới hạn, mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết bằng cách viện dẫn các ví dụ được ưu tiên, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng có thể tiến hành các cải biến hoặc các thay thế tương đương đối với giải pháp kỹ thuật theo sáng chế miễn là các cải biến hoặc thay thế này không nằm ngoài phạm vi của giải pháp kỹ thuật theo sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*, trong đó protein Vip3Aa tồn tại trong tế bào cây đậu tương tổng hợp protein Vip3Aa, và côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3Aa nhờ ăn tế bào cây đậu tương, trình tự axit amin của protein Vip3Aa có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 mà được mã hóa bởi trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4.
2. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 1, trong đó protein Vip3Aa tồn tại trong cây chuyển gen tổng hợp protein Vip3Aa, côn trùng gây hại *Spodoptera litura* tiếp xúc với protein Vip3Aa nhờ ăn các mô của cây chuyển gen, và sự phát triển của côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bị ức chế và/hoặc côn trùng gây hại *Spodoptera litura* bị chết sau khi tiếp xúc, nhờ vậy kiểm soát được sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng.
3. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 2, trong đó cây chuyển gen có thể ở giai đoạn phát triển bất kỳ.
4. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 2, trong đó mô của cây chuyển gen được chọn từ lá, thân, cò, cụm hoa cái, bao phấn, chỉ nhị và quả.
5. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 2, trong đó kiểm soát sự gây hại của *Spodoptera litura* đối với cây trồng không bị thay đổi theo sự thay đổi vị trí trồng và/hoặc thời điểm trồng.
6. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó bước trước bước tiếp xúc là trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Vip3Aa.
7. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó cây trồng này cũng chứa ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Vip3Aa.
8. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 7, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.

9. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 8, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Fa hoặc protein Cry 1Ba.
10. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 9, trong đó trình tự nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.
11. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura* theo điểm 7, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế gen ở côn trùng gây hại *Spodoptera litura*.

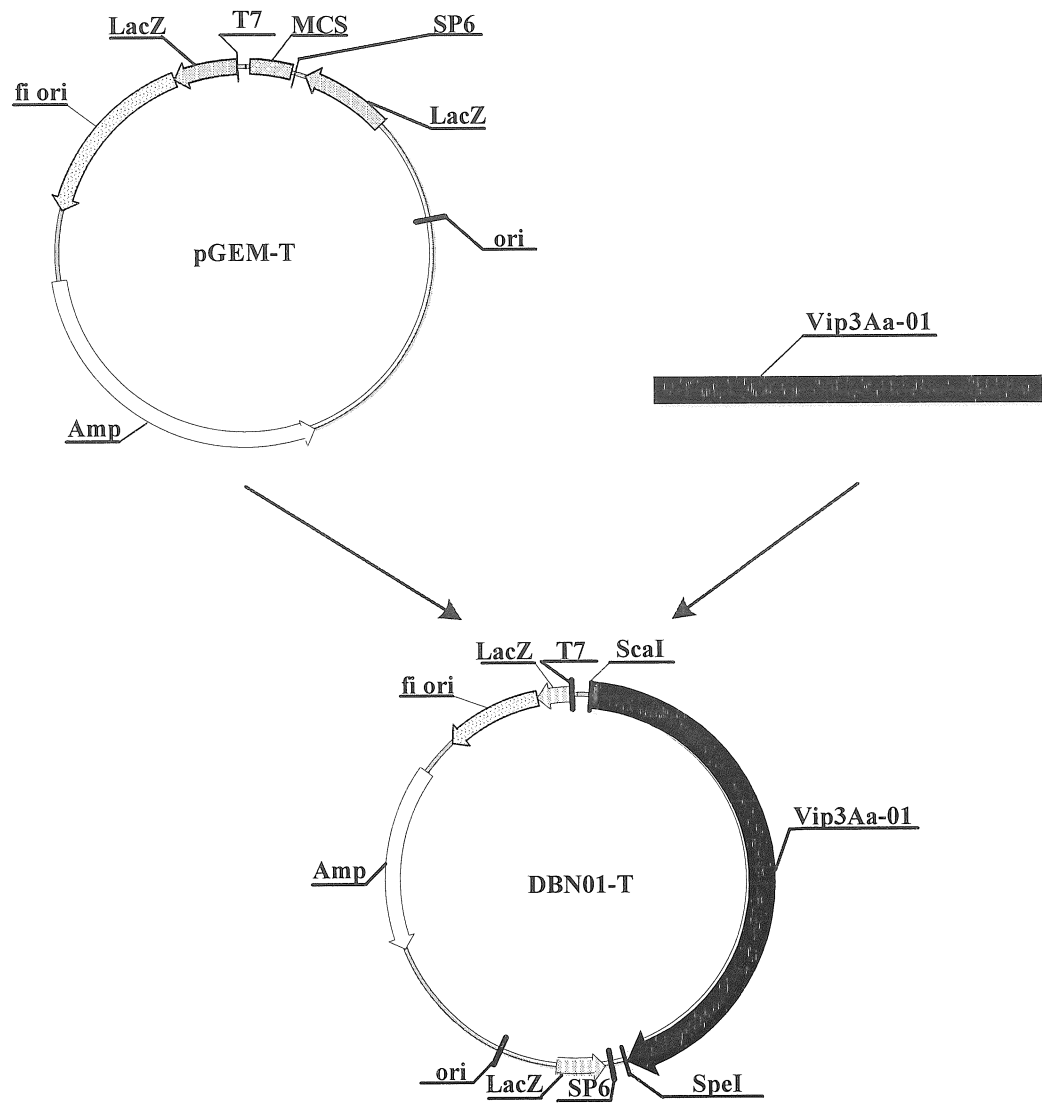


Fig.1

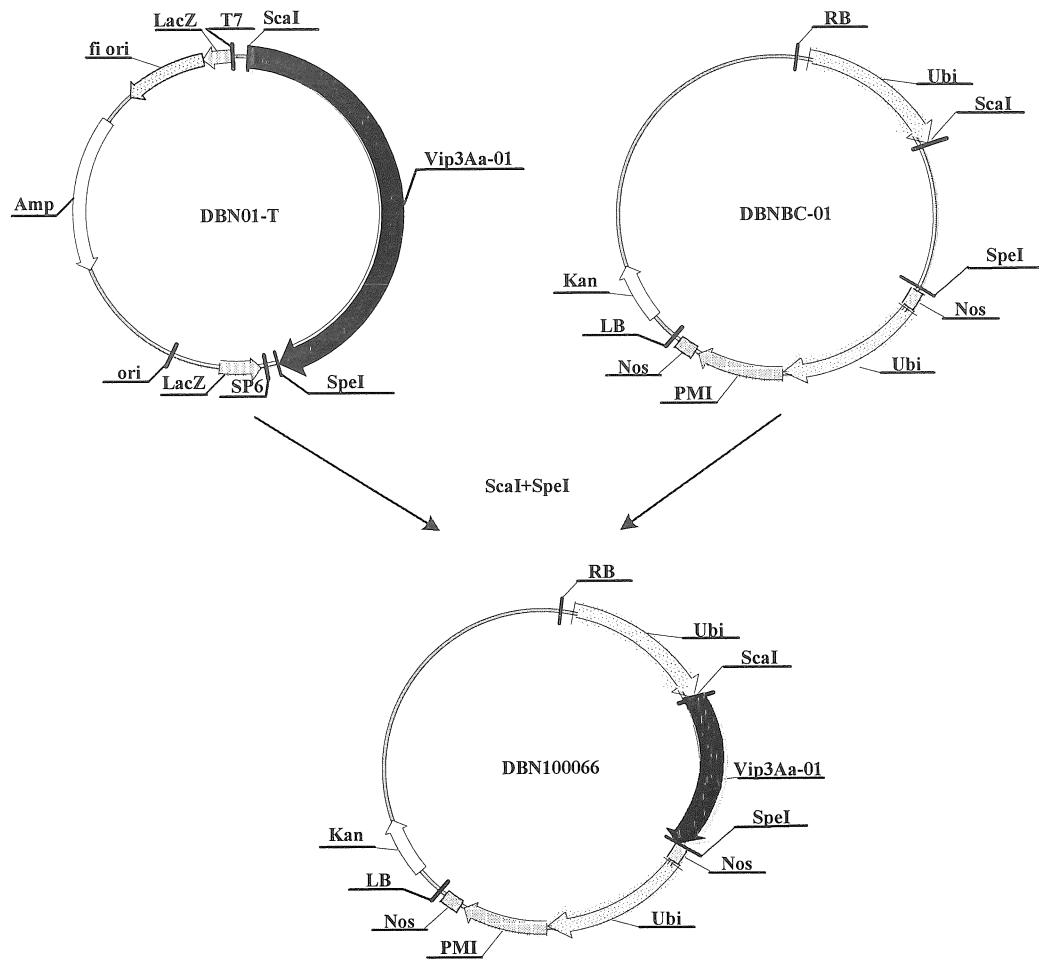


Fig.2

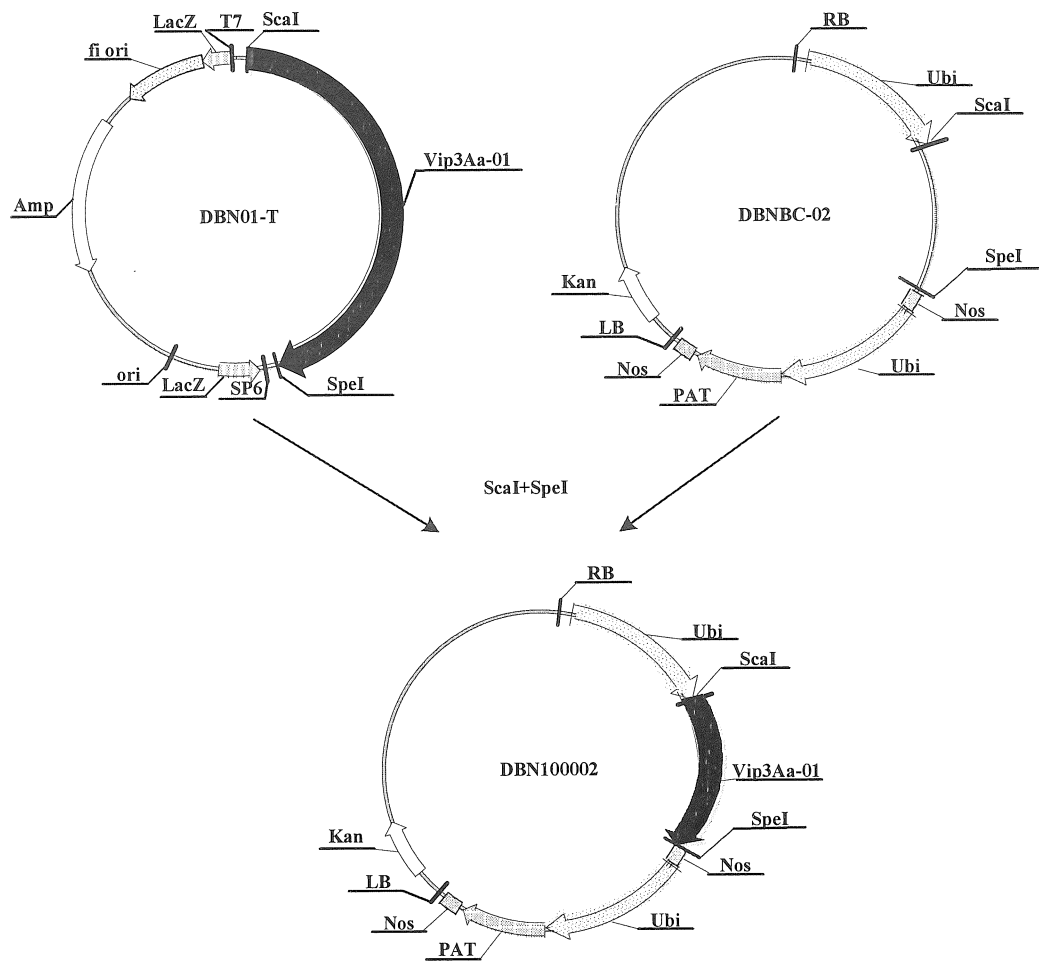
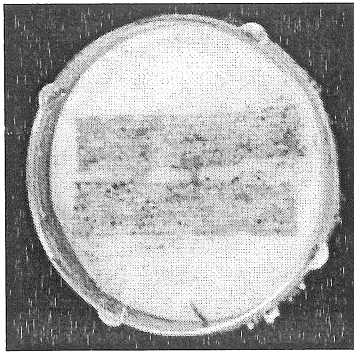
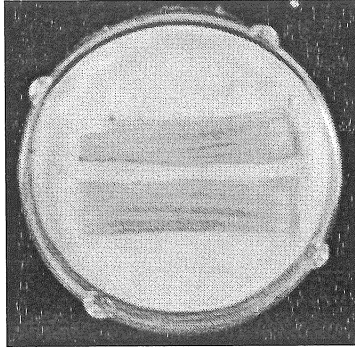


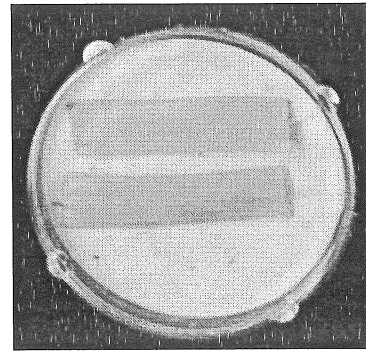
Fig.3



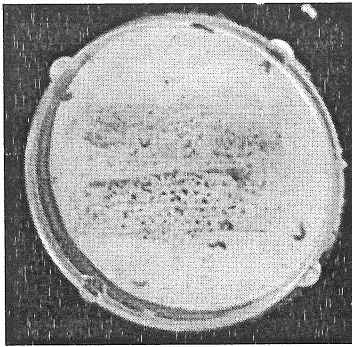
CK1



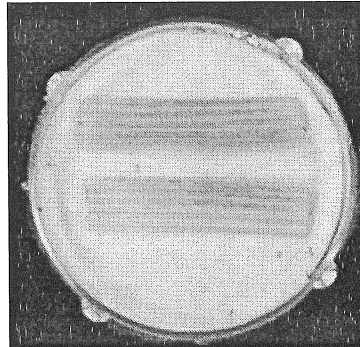
Zm-Vip3Aa-01



Zm-Vip3Aa-01-Cry1Ab



NGM1



Zm-Vip3Aa-02-Cry1Fa

Fig.4

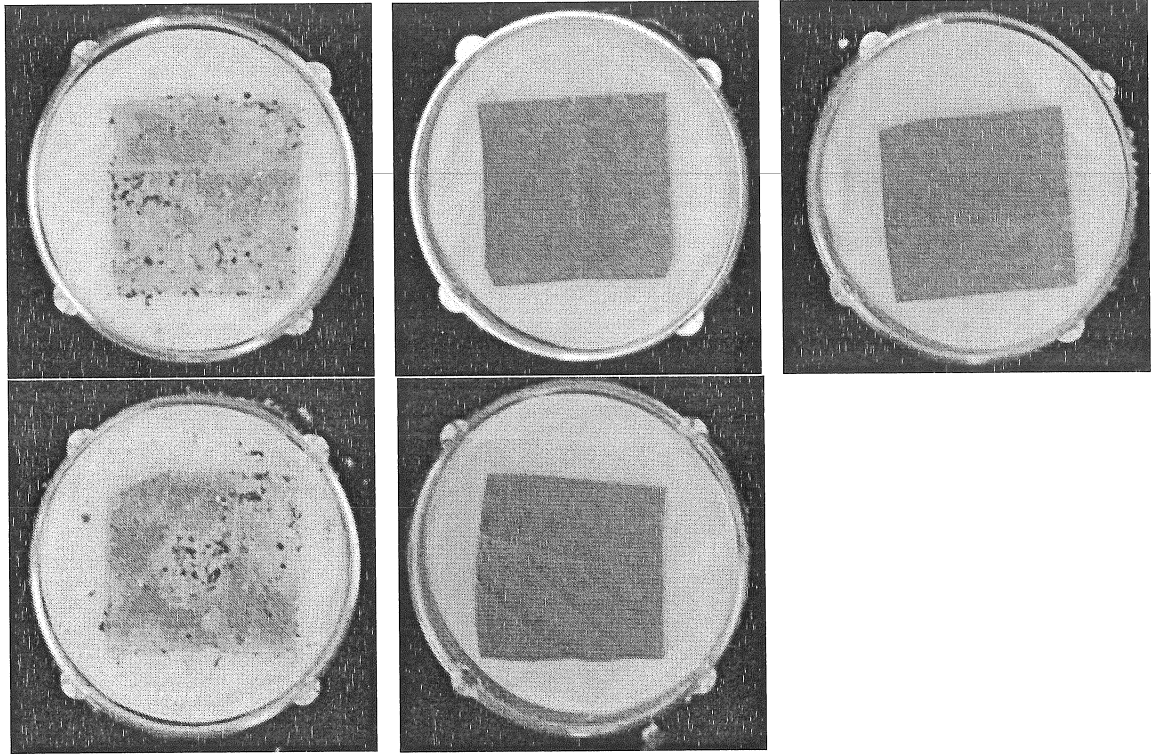


Fig.5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> BEIJING DABEINONG TECHNOLOGY GROUP CO., LTD.
 BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.

<120> Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Spodoptera litura*

<130> DBNBC32

<160> 22

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 789
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin Vip3Aa-01

<400> 1

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
 50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val

145		150		155		160
Leu Ile Asn Ser Thr	Leu Thr Glu Ile Thr	Pro Ala Tyr Gln Arg Ile				
	165	170		175		
Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu	Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr					
	180	185		190		
Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp	Ile Leu Asp Glu					
	195	200		205		
Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr	Lys Asn Asp Val					
	210	215		220		
Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly						
	225	230		235		240
Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile						
	245	250		255		
Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr						
	260	265		270		
Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr						
	275	280		285		
Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr						
	290	295		300		
Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val						
	305	310		315		320
Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala						
	325	330		335		
Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys						
	340	345		350		
Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr						
	355	360		365		
Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp						
	370	375		380		
Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu						

```

385                               390                               395                               400

Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
      405                               410                               415

Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
      420                               425                               430

Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
      435                               440                               445

Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
      450                               455                               460

Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
465                               470                               475                               480

Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
      485                               490                               495

Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
      500                               505                               510

Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
      515                               520                               525

Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
      530                               535                               540

Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
545                               550                               555                               560

Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
      565                               570                               575

Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
      580                               585                               590

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
      595                               600                               605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
      610                               615                               620

Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr

```

625

630

635

640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670

Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
 675 680 685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700

Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720

Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735

Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
 755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
 770 775 780

Asp Val Ser Ile Lys
 785

<210> 2
 <211> 789
 <212> PRT
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự axit amin Vip3Aa-02

<400> 2

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe
 1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp
 20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu
 35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys
 50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln
 85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr
 100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val
 115 120 125

Ile Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys
 130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val
 145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile
 165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr
 180 185 190

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu
 195 200 205

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val
 210 215 220

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly
 225 230 235 240

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile
 245 250 255

Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr
 260 265 270

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr
 275 280 285
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr
 290 295 300
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val
 305 310 315 320
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys
 340 345 350
 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr
 355 360 365
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp
 370 375 380
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu
 385 390 395 400
 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe
 405 410 415
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys
 420 425 430
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly
 435 440 445
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala
 485 490 495
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg
 500 505 510

Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile
 515 520 525

Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile
 530 535 540

Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr
 545 550 555 560

Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His
 565 570 575

Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys
 580 585 590

Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His
 595 600 605

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn
 610 615 620

Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr
 625 630 635 640

Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu
 645 650 655

Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys
 660 665 670

Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly
 675 680 685

Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg
 690 695 700

Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg
 705 710 715 720

Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser
 725 730 735

Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val
 740 745 750

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu
755 760 765

Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr
770 775 780

Asp Val Ser Ile Lys
785

<210> 3
<211> 2370
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> trình tự nucleotit Vip3Aa-01

<400> 3
atgaacaaga acaacaccaa gctctccaca cgggcacttc cctcctttat tgactacttt 60
aatggcatct atgggtttgc tacggggatc aaggacatta tgaacatgat cttcaagaca 120
gacactggcg gggatcttac gctcgacgag attcttaaga atcagcaact cctgaacgat 180
atctctggca agctggacgg cgtgaatggg tcaactaacg acctcatcgc tcaggggaat 240
ctcaacacag aactgtctaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaagttctt 300
aatgatgtga acaataagct cgacgccatc aacacaatgc ttcgcgtgta cctcccaaag 360
attactagca tgctctcgga cgtcatgaag cagaactacg cgctgtccct tcaaattgag 420
tatctgagca agcagcttca agaaatctcg gacaagctgg atatcattaa tgtgaacgtc 480
ctcatcaaca gcaccctgac ggagattaca ccggcgtacc agaggatcaa gtatgtgaat 540
gagaagttcg aggaactcac ttttgctaca gaaacttcca gcaagggtcaa gaaggatggc 600
tcaccagccg acatcctgga tgagcttaca gaactcactg agctggcgaa gtccgtgacc 660
aagaatgacg tcgatggctt cgagttttac ctgaacacgt tccacgacgt tatgggtggc 720
aacaatcttt ttgggcggag cgctctcaag actgcatcgg aactgatcac caaggagaac 780
gttaagacga gcggctcgga ggtcgggaat gtttacaact tccttatcgt cctcaccgca 840
ctccaggccc aagcgtttct cacgctgacc acctgccgca agctcctcgg cctcgcagac 900
atcgattaca cctccatcat gaacgagcac ctgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg 960
aatatccttc cgacactctc gaacactttt tctaattcaa actacgctaa ggtcaagggc 1020
tccgacgaag atgcaaagat gatcgttgag gccaaagcctg gccatgcgct catcgggttc 1080
gagatttcta acgactcaat taccgtgctg aaggtctacg aggcgaagct caagcagaat 1140

tatcaagtgg acaaggattc tctgtcagag gttatctacg gcgacatgga taagctgctt	1200
tgccctgatc agtccgagca aatctactat acgaacaata ttgtcttccc caacgaatac	1260
gtgatcacca agattgactt tacgaagaag atgaagacac tccggtacga ggtgacggct	1320
aacttctatg attcgtctac gggcgagatc gacctcaaca agaagaagggt cgaatcatcc	1380
gaggccgaat acagaaccct gtcggcgaac gacgatggcg tgtatatgcc tcttggggtc	1440
atttctgaga ccttcctcac gccatcaat ggctttgggc tccaggcaga tgagaactcc	1500
cgctgatca cccttacgtg caagagctac ctcagggagc tgctgcttgc caccgacctc	1560
tctaacaagg aaacgaagct gatcggtccg ccatcaggct tcatctccaa tattgtggag	1620
aacgggtcaa ttgaggaaga taatctggaa ccggtgaagg ctaacaataa gaacgcatac	1680
gttgaccaca caggcggggg gaatggcact aaggcgctct atgtgcataa ggatgggtggc	1740
atctcccagt tcattggcga caagctgaag ccgaagacag aatacgtgat tcaatatact	1800
gtgaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca cagggtacat ccattacgaa	1860
gatactaaca acaacctgga ggactaccag acaatcaata agaggttcac aactggcact	1920
gacctgaagg ggggtctatct tattctcaag tcccagaatg gcgatgaggc ctggggcgac	1980
aacttcatca ttctcgaaat ctcccctagc gagaagctcc tgagccccga gctgattaac	2040
accaataact ggacatccac tggcagcacg aatatctcg ggaacaccct gacgctttac	2100
cagggcgggg gaggcattct gaagcagaac ctccaactgg attcgttctc tacctacaga	2160
gtctatTTTT cagtttccgg cgacgcgaat gtgcgcatca ggaactcgcg ggaagtcctc	2220
ttc̃gagaaga gatacatgtc tggcgctaag gatgtgtcag aaatgttcac cacgaagttt	2280
gagaaggaca actttttatat cgaactgtcc caagggaata acctctacgg cggccccatt	2340
gttcattttt acgacgtgag catcaagtga	2370

<210> 4

<211> 2370

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit Vip3Aa-02

<400> 4

atgaacaaga acaacaccaa gctctccaca cgggcacttc cctcctttat tgactacttt	60
aatggcatct atggggtttgc tacggggatc aaggacatta tgaacatgat cttcaagaca	120
gacactggcg gggatcttac gctcgacgag attcttaaga atcagcaact cctgaacgat	180
atctctggca agctggacgg cgtgaatggg tcacttaacg acctcatcgc tcaggggaat	240

ctcaacacag aactgtctaa ggagatcctc aagattgcaa atgagcagaa ccaagttctt	300
aatgatgtga acaataagct cgacgccatc aacacaatgc ttcgcgtgta cctcccaaag	360
attactagca tgctctcgga cgtcattaag cagaactacg cgctgtccct tcaaattgag	420
tatctgagca agcagcttca agaaatctcg gacaagctgg atatcattaa tgtgaacgtc	480
ctcatcaaca gcaccctgac ggagattaca ccggcgtacc agaggatcaa gtatgtgaat	540
gagaagttcg aggaactcac ttttgctaca gaaacttcca gcaaggtcaa gaaggatggc	600
tcaccagccg acatcctgga tgagcttaca gaactcactg agctggcgaa gtccgtgacc	660
aagaatgacg tcgatggctt cgagttttac ctgaacacgt tccacgacgt tatgggtgggc	720
aacaatcttt ttgggcggag cgctctcaag actgcatcgg aactgatcac caaggagaac	780
gttaagacga gcggctcgga ggtcgggaat gtttacaact tccttatcgt cctcaccgca	840
ctccaggccc aagcgtttct cacgctgacc acctgccgca agctcctcgg cctcgcagac	900
atcgattaca cctccatcat gaacgagcac ctgaacaagg agaaggagga gttccgcgtg	960
aatatccttc cgacactctc gaacactttt tctaatacaa actacgctaa ggtcaagggc	1020
tccgacgaag atgcaaagat gatcggtgag gccaaagcctg gccatgcgct catcgggttc	1080
gagattttcta acgactcaat taccgtgctg aaggctctacg aggcgaagct caagcagaat	1140
tatcaagtgg acaaggattc tctgtcagag gttatctacg gcgacatgga taagctgctt	1200
tgccctgata agtccgagca aatctactat acgaacaata ttgtcttccc caacgaatac	1260
gtgatcacca agattgactt tacgaagaag atgaagacac tccggtacga ggtgacggct	1320
aacttctatg attcgtctac gggcgagatc gacctcaaca agaagaaggt cgaatcatcc	1380
gaggccgaat acagaaccct gtccggcaac gacgatggcg tgtatatgcc tcttggggtc	1440
atctctgaga ccttcctcac gcccatcaat ggctttgggc tccaggcaga tgagaactcc	1500
cgctgatca cccttacgtg caagagctac ctcaggggagc tgctgcttgc caccgacctc	1560
tctaacaagg aaacgaagct gatcgttccg ccatcaggct tcatctccaa tattgtggag	1620
aacgggtcaa ttgaggaaga taatctggaa ccgtggaagg ctaacaataa gaacgcatac	1680
gttgaccaca caggcggggg gaatggcact aaggcgctct atgtgcataa ggatgggtggc	1740
atctcccagt tcattggcga caagctgaag ccgaagacag aatacgtgat tcaatatact	1800
gtgaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca cagggtacat ccattacgaa	1860
gatactaaca acaacctgga ggactaccag acaatcaata agaggttcac aactggcact	1920
gacctgaagg gggctctatc tattctcaag tcccagaatg gcgatgaggc ctggggcgac	1980
aacttcatca ttctcgaaat ctcccctagc gagaagctcc tgagccccga gctgattaac	2040

accaataact ggacatccac tggcagcacg aatatctcgg ggaacaccct gacgctttac 2100
 cagggcgggga gaggcattct gaagcagaac ctccaactgg attcgttctc tacctacaga 2160
 gtctatTTTT cagtttccgg cgacgcgaat gtgcgcatca ggaactcgcg ggaagtctc 2220
 ttcgagaaga gatacatgtc tggcgctaag gatgtgtcag aaatgttcac cacgaagttt 2280
 gagaaggaca acttttatat cgaactgtcc caaggggaata acctctacgg cggccccatt 2340
 gttcattttt acgacgtgag catcaagtga 2370

<210> 5
 <211> 2457
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> trình tự nucleotit Cry1Ab

<400> 5
 atggacaaca acccaaacat caacgagtgc atcccgtaga actgcctcag caaccctgag 60
 gtcgaggtgc tcggcggtga gcgcacgag accggttaca ccccatcga catctccctc 120
 tccctcacgc agttcctgct cagcgagttc gtgccaggcg ctggcttcgt cctgggcctc 180
 gtggacatca tctggggcat ctttggcccc tccagtgagg acgccttcct ggtgcaaatc 240
 gagcagctca tcaaccagag gatcgaggag ttccgcagga accaggccat cagccgcctg 300
 gagggcctca gcaacctcta ccaaattctac gctgagagct tccgcgagtg ggaggccgac 360
 cccactaacc cagctctccg cgaggagatg cgcattcagt tcaacgacat gaacagcgcc 420
 ctgaccaccg ccatccact cttcgccgtc cagaactacc aagtcccgct cctgtccgtg 480
 tacgtccagg ccgccaacct gcacctcagc gtgctgaggg acgtcagcgt gtttggccag 540
 aggtgggggt tcgacgccgc caccatcaac agccgttaca acgacctcac caggctgac 600
 ggcaactaca ccgaccacgc tgtecgctgg tacaactctg gcctggagcg cgtctggggc 660
 cctgattcta gagactggat tcgtctaacac cagttcaggc gcgagctgac cctcacctgc 720
 ctggacattg tgtccctctt cccgaactac gactcccgca cctaccgat ccgcaccgtg 780
 tcccaactga cccgcgaaat ctacaccaac cccgtcctgg agaacttcga cggtagcttc 840
 aggggcagcg cccagggcct cgagggtcc atcaggagcc cacacctgat ggacatctc 900
 aacagcatca ctatctacac cgatgccac cgcggcgagt actactggtc cggccaccag 960
 atcatggcct ccccggtcgg cttcagcggc cccgagttta cctttcctct ctacggcacg 1020
 atgggcaacg ccgctccaca acaacgcac gtgcgtcagc tgggcccagg cgtctaccgc 1080
 acctgagct ccacctgta ccgcaggccc ttcaacatcg gtatcaacaa ccagcagctg 1140

```

tccgtcctgg atggcactga gttcgcttac ggcacctcct ccaacctgcc ctccgctgtc 1200
taccgcaaga gcggcacggt ggattccctg gacgagatcc caccacagaa caacaatgtg 1260
ccccccaggc aggggtttttc ccacaggctc agccacgtgt ccatgttccg ctccggcttc 1320
agcaactcgt ccgtgagcat catcagagct cctatgttct cctggattca tcgcagcgcg 1380
gagttcaaca atatcattcc gtccctccaa atcacccaaa tccccctcac caagtccacc 1440
aacctgggca gcggcacctc cgtgggtgaag ggcccaggct tcacggggcg cgacatcctg 1500
cgcaggacct ccccgggcca gatcagcacc ctccgcgtca acatcacccg tcccctgtcc 1560
cagaggtacc gcgtcaggat tcgctacgt agcaccacca acctgcaatt ccacacctcc 1620
atcgacggca ggccgatcaa tcagggtaac ttctccgcca ccatgtccag cggcagcaac 1680
ctccaatccg gcagcttccg caccgtgggt ttaccaccc ccttcaactt ctccaacggc 1740
tccagcgttt tcaccctgag cgcccacgtg ttcaattccg gcaatgaggt gtacattgac 1800
cgcattgagt tcgtgccagc cgaggtcacc ttgaagccg agtacgacct ggagagagcc 1860
cagaaggctg tcaatgagct cttcacgtcc agcaatcaga tcggcctgaa gaccgacgtc 1920
actgactacc acatcgacca agtctccaac ctcgtaggag gcctctccga tgagttctgc 1980
ctcgacgaga agaaggagct gtccgagaag gtgaagcatg ccaagcgtct cagcgacgag 2040
aggaatctcc tccaggacct caatttccgc ggcacaaaca ggcagctcga ccgcggtcgg 2100
cgcggcagca ccgacatcac gatccagggc ggcgacgatg tgttcaagga gaactacgtg 2160
actctcctgg gcactttcga cgagtgtac cctacctact tgtaccagaa gatcgatgag 2220
tccaagctca aggcttacac tcgctaccag ctccgcggct acatcgaaga cagccaagac 2280
ctcgagattt acctgatccg ctacaacgcc aagcacgaga ccgtcaacgt gcccggtact 2340
ggttccctct ggccgctgag cgcgccagc ccgatcggca agtgtgcca ccacagccac 2400
cacttctcct tggacatcga tgtgggctgc accgacctga acgaggactt tcggtag 2457

```

<210> 6

<211> 1818

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> trình tự nucleotit Cry1Fa

<400> 6

```

atggagaaca acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tcctgaagta 60
gagattctca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
acacgtttcc tgttgtctga gtttgttcca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac 180

```

```

ctcatctggg gcttcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag      240
ttgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg ccatcactac ccttcgtggc      300
ttagcagaca gctatgagat ctacattgaa gcactaagag agtgggaagc caatcctaac      360
aatgccaac tgagagaaga tgtgcgata cgctttgcta acacagatga tgctttgatc      420
acagccatca acaacttcac ccttaccagc ttcgagatcc ctcttctctc ggtctatggt      480
caagctgcta acctgcactt gtcactactg cgcgacgctg tgcggtttgg gcaaggttgg      540
ggactggaca tagctactgt caacaatcac tacaacagac tcatcaatct gattcatcga      600
tacacgaaac attgtttgga tacctacaat cagggtattgg agaacctgag aggtactaac      660
actcgccaat gggccagggt caatcagttc aggagagacc ttacacttac tgtgttagac      720
atagttgctc tctttccgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgattcaaac gtcatcccaa      780
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgcgaacata      840
cccaatgggt tcaacagggc tgagtttgga gtcagaccac cccatctcat ggacttcatg      900
aactctttgt ttgtgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgtgggg aggacactta      960
gttagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaacttct ctagttacgg ggtcttcaat     1020
cccgggggcg ccatctggat tgcagatgaa gatccacgtc ctttctatcg gacctgtca     1080
gatcctgtct tcgtccgagg aggccttggc aatcctcact atgtactcgg tcttagggga     1140
gtggcctttc aacaaactgg tacgaatcac accgcacat tcaggaactc cgggaccatt     1200
gactctctag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg caccttggaa tgactactcc     1260
catgtgctga atcatgttac ctttgtgctc tggccagggt agatctcagg ttccgactca     1320
tggagagcac caatgttctc ttggacgcat cgtagcgcta cccccacaaa caccattgat     1380
ccagagagaa tcaactcagat tcccttgggt aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca     1440
gttgtaagag ggccgggggt cacgggagga gacattcttc gacgcactag tggaggacca     1500
ttcggttaca ccattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggatatc tgccaggata     1560
cgctatgcct ctactaccaa tctaagaatc tacgttacgg ttgcagggtga acggatcttt     1620
gctggctcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatccac ttacattcca atctttctcc     1680
tacgccacta tcaacaccgc gttcaccttt ccaatgagcc agagcagttt cacagtaggt     1740
gctgatacct tcagttcagg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gattccagtt     1800
actgccacac tcgagtaa

```

<210> 7
<211> 1992
<212> ADN

<213> ngô

<400> 7

ctgcagtgca ggcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta	60
agttataaaa aattaccaca tttttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta	120
tctttataca tatattttaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa	180
tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaaa ggacaattga	240
gtattttgac aacaggactc tacagtttta tcttttttagt gtgcattgtgt tctccttttt	300
ttttgcaaat agcttcacct atataatact tcatccattt tattagtaca tccatttagg	360
gttttaggggt aatgggtttt atagactaat ttttttagta catctatttt attctatttt	420
agcctctaaa ttaagaaaac taaaactcta ttttagtttt tttattttaat aatttagata	480
taaaatagaa taaaataaag tgactaaaaa ttaaacaat accctttaag aaattaaaaa	540
aactaaggaa acatttttct tgtttcgagt agataatgcc agcctgttaa acgccgtcga	600
cgagtctaac ggacaccaac cagcgaacca gcagcgtcgc gtcggggcaa gcgaagcaga	660
cggcacggca tctctgtcgc tgccctctga cccctctcga gagttccgct ccaccgttgg	720
acttgctccg ctgtcggcat ccagaaattg cgtggcggag cggcagacgt gagccggcac	780
ggcaggcggc ctccctctcc tctcacggca cggcagctac gggggattcc tttcccaccg	840
ctccttcgct ttccttctcc cgcgcgcgt aataaataga caccctctcc acaccctctt	900
tccccaacct cgtgttggtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattcac	960
ccgtcggcac ctccgcttca aggtacgccg ctgctctcc ccccccccc ctctctacct	1020
tctctagatc ggcgttccgg tccatgggtta gggcccggta gttctacttc tgttcatgtt	1080
tgtgttagat ccgtgtttgt gttagatccg tgctgctage gttcgtacac ggatgcgacc	1140
tgtacgtcag acacgttctg attgctaaat tgccagtgtt tctctttggg gaatcctggg	1200
atggctctag ccgttccgca gacgggatcg atttcatgat tttttttgtt tcgttgcata	1260
gggtttgggt tgcccttttc ctttatttca atatatgccg tgcacttggt tgtcgggtca	1320
tcttttcatg cttttttttg tcttggttgt gatgatgtgg tctggttggg cggtcgttct	1380
agatcggagt agaattctgt ttcaaactac ctggtggatt tattaatttt ggatctgtat	1440
gtgtgtgcca tacatattca tagttacgaa ttgaagatga tggatggaaa tatcgatcta	1500
ggataggtat acatgttgat gcgggtttta ctgatgcata tacagagatg ctttttgttc	1560
gcttggttgt gatgatgtgg tgtggttggg cggtcgttca ttcgttctag atcggagtag	1620
aatactgttt caaactacct ggtgtattta ttaattttgg aactgtatgt gtgtgtcata	1680
catcttcata gttacgagtt taagatggat ggaaatatcg atctaggata ggtatacatg	1740

ttgatgtggg ttttactgat gcatatacat gatggcatat gcagcatcta ttcatatgct 1800
 ctaaccttga gtacctatct attataataa acaagtatgt tttataatta ttttgatctt 1860
 gatatacttg gatgatggca tatgcagcag ctatatgtgg attttttttag cctgccttc 1920
 atacgctatt tatttgcttg gtactgtttc ttttgtcgat gctcacctg ttgtttggtg 1980
 ttacttctgc ag 1992

<210> 8
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> agrobacterium tumefaciens

<400> 8
 gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggttttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 9
 <211> 1176
 <212> ADN
 <213> escherichia coli

<400> 9
 atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact 60
 gaacttttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
 catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
 gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaaacg ctttggcgaa 240
 ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
 aacaaacaca attctgaaat cgggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360
 gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420
 cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480
 gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
 agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccg cgcgctggcg 600
 attttaaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
 tctgaatttt acccggaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa 720
 ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780

gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
 tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900
 ttgttgaccc agccggtgaa acaagggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960
 tttgccttct cgtgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
 gccatthttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttggtga aaggttctca gcagttacag 1080
 cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140
 cacggccggt tagcgctgt ttacaacaag ctgtaa 1176

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 1

<400> 10
 attctcgaaa tctcccctag cg 22

<210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 2

<400> 11
 gctgccagtg gatgtccag 19

<210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mẫu dò 1

<400> 12
 ctcttgagcc ccgagctgat taacacc 27

<210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 3

<400> 13
 attctcgaaa tctcccctag cg 22

<210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 4

<400> 14
 gctgccagtg gatgtccag 19

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mẫu dò 2

<400> 15
 ctcttgagcc ccgagctgat taacacc 27

<210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 5

<400> 16
 cgaactacga ctcccgcac 19

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 6

<400> 17
 gtagatttcg cgggtcagtt g 21

<210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mẫu dò 3

<400> 18	
ctacccgatc cgcaccgtgt cc	22
<210> 19	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> đoạn mỗi 7	
<400> 19	
cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg	27
<210> 20	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> đoạn mỗi 8	
<400> 20	
acgcgaatgg tcctccacta g	21
<210> 21	
<211> 27	
<212> ADN	
<213> trình tự nhân tạo	
<220>	
<223> mẫu dò 4	
<400> 21	
cgtcgaagaa tgtctcctcc cgtgaac	27
<210> 22	
<211> 552	
<212> ADN	
<213> streptomycete viridis	
<400> 22	
atgtctccgg agaggagacc agttgagatt aggccagcta cagcagctga tatggccgcg	60
gtttgtgata tcgttaacca ttacattgag acgtctacag tgaacttttag gacagagcca	120
caaacaccac aagagtggat tgatgatcta gagaggttgc aagatagata cccttggttg	180
gttgctgagg ttgaggggtgt tgtggctggc attgcttacg ctgggccctg gaaggctagg	240
aacgcttacg attggacagt tgagagtact gtttacgtgt cacataggca tcaaaggttg	300
ggcctaggat ccacattgta cacacatttg cttaagtcta tggaggcgca aggttttaag	360
tctgtgggtg ctgttatagg ccttccaaac gatccatctg ttaggttgca tgaggctttg	420

ggatacacag cccggggtac attgcgcgca gctggataca agcatggtgg atggcatgat	480
gttggttttt ggcaaaggga ttttgagttg ccagctcctc caaggccagt taggccagtt	540
accagatct ga	552