(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) **1-0037819**

(51)[7] **C12N 15/82**; A24B 15/20; C12N 9/00; A01H 5/12; A24B 3/12

(13) **B**

(21) 1-2018-01211
(22) 06/09/2016
(86) PCT/EP2016/070972 06/09/2016
(87) WO 2017/042162 A1 16/03/2017
(30) 15184528.6 09/09/2015 EP
(45) 25/12/2023 429
(43) 25/07/2018 364A
(73) Philip Morris Products S.A. (CH)
Quai Jeanrenaud 3, CH-2000 Neuchatel, Switzerland
(72) BOVET, Lucien (CH).
(74) Công ty TNHH Tư vấn đầu tư và chuyển giao công nghệ (INVESTCONSULT)

(54) CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN, KHÔNG CÓ TRONG TỰ NHIÊN HOẶC ĐỘT BIẾN HOẶC BỘ PHẬN CỦA NÓ, NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT, SẢN PHẨM THỰC VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT, SẢN PHẨM THUỐC LÁ HOẶC VẬT DỤNG HÚT THUỐC VÀ PHƯƠNG PHÁP BIẾN ĐỔI CÂY THUỐC LÁ

(57) Sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó có sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm, asparagin synthetaza đã nêu gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm: (i) trình tự polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90% hoặc độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%; hoặc (ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i); hoặc (iii) polypeptit có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%; trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii) hoặc (iii) được giảm so với thực vật đối chứng. Sáng chế còn đề cập đến nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật, phương pháp tạo ra nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí, sản phẩm thuốc lá hoặc vật dụng hút thuốc bao gồm nguyên liệu thực vật này và phương pháp biến đổi cây thuốc lá để bao gồm polynucleotit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các trình tự polynucleotit của các gen mã hóa asparagin synthetaza từ *Nicotiana tabacum* và các biến thể, các đồng đẳng và các mảnh của chúng. Các trình tự polypeptit được mã hóa bởi chúng và các biến thể, các đồng đẳng và các mảnh của chúng cũng được đề cập. Sự biến đổi trong sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen này hoặc hoạt tính của (các) protein được mã hóa, nhờ đó, điều biến nồng độ asparagin trong thực vật được đề cập.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Acrylamit là hợp chất hóa học có công thức C_3H_5NO (danh pháp IUPAC là prop-2-enamit) và các lo ngại đã được nêu ra, liên quan đến độc tính tiềm năng của nó. Nguồn gốc của acrylamit trong sol khí của các vật dụng hút thuốc chứa thuốc lá có thể là axit amin asparagin có thể có trong nguyên liệu thuốc lá được sử dụng để sản xuất các vật dụng tạo khói đã nêu. Do đó, có thể được mong muốn là giảm nồng độ của các axit amin nhất định - như asparagin - trong thực vật, đặc biệt là trong các thực vật mà được sử dụng để sản xuất thuốc lá.

US2013/0068240 mô tả các cây thuốc lá được biến đổi di truyền và các sản phẩm thuốc lá thể hiện sự giảm ở ít nhất là một axit amin sao cho sau khi làm nóng và/hoặc đốt cháy, thuốc lá tạo ra nồng độ được giảm xuống của hợp chất được chuyển hóa từ ít nhất một axit amin so với cây thuốc lá bố mẹ không được biến đổi. Gây đột biến hạt bằng etyl metan sulfonat (EMS) để thu được các giống thuốc lá đột biến với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong khói thuốc lá được mô tả. Các giống đột biến EMS khác được mô tả trong US2013/0068240. Trong lá thuộc phần thân trên được làm khô bằng không khí nóng, ba giống đột biến EMS, tên là FC Up 10NH-5, FC Up 10NH-18 và FC-Up 10NH-23 thể hiện: (i) sự giảm asparagin tương ứng là 71%, 30% và 62%; (ii) sự giảm acrylamit trong khói thuốc lá, tương ứng là 47%, 42% và 44%; và (iii) nồng độ nicotin tương ứng là giảm 38%, tăng 111% và giảm 19% trong lá

thuộc phần thân trên của cây thuốc lá được làm khô bằng không khí nóng. Do đó, mức độ cao nhất của việc giảm asparagin và acrylamit tương ứng là 71% và 47%, đã đạt được với giống đột biến FC Up 10NH-5. Tuy nhiên, trong giống đột biến này, nồng độ nicotin đã thể hiện sự giảm 38% so với đối chứng. Trong các lá thuộc phần thân giữa được làm khô bằng không khí nóng, ba giống đột biến EMS, tên là FC Mid10NH-5, FC Up 10NH-18 và FC-Up 10NH-23 thể hiện: (i) nồng độ asparagin giảm 6%, tăng 531% và giảm 29%, tương ứng; (ii) nồng độ acrylamit giảm 19%, tăng 140% và tăng 200% trong khói thuốc lá, tương ứng; và (iii) nồng độ nicotin giảm 36%, tăng 113% và giảm 19% trong lá thuộc phần thân giữa của cây thuốc lá được làm khô bằng không khí nóng, tương ứng. Do đó, mức độ cao nhất của việc giảm acrylamit là 19% đã đạt được với FC Up 10NH-5 nhưng nồng độ của asparagin chỉ giảm 6% và nồng độ nicotin giảm 36%.

Mức độ cao nhất của việc giảm asparagin và acrylamit là 71% và 47%, tương ứng, được phát hiện thấy trong lá thuộc phần thân trên được làm khô bằng không khí nóng của FC Up 10NH-5. Tuy nhiên, trong giống đột biến này nồng độ nicotin thể hiện sự giảm 38% so với đối chứng. Trong lá thuộc phần thân giữa được làm khô bằng không khí nóng của FC Up 10NH-5, nồng độ acrylamit chỉ giảm 19%, nồng độ asparagin chỉ giảm 6% và một lần nữa có sự giảm nồng độ nicotin (là 36%) so với đối chứng.

Sự giảm nồng độ nicotin là không mong muốn vì người tiêu thụ sản phẩm thuốc lá sẽ cần phải tiêu thụ nhiều thuốc lá hơn để nhận được nồng độ nicotin giống như vậy. Ngoài ra, cũng rõ ràng từ các kết quả được trình bày trong US2013/0068240 rằng nồng độ của asparagin, acrylamit và nicotin khác nhau nhiều và ngẫu nhiên giữa các giống đột biến EMS khác nhau.

Có mong muốn để tìm ra cách khác để giảm nồng độ của asparagin trong thực vật và nhờ đó tối thiểu hóa lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra từ phần thực vật được làm nóng hoặc đốt cháy. Cũng có mong muốn để tìm ra cách để giảm hơn nữa lượng acrylamit đến nồng độ mà thấp hơn nồng độ được bộc lộ trong US2013/0068240. Cũng có mong muốn để giữ nguyên được nồng độ nicotin trong thực vật. Cũng có mong muốn để phát triển các phương pháp mà có thể tạo ra một cách ổn định các thực vật có các đặc tính này. Sáng chế tìm cách giải quyết nhu cầu này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáu gen asparagin synthetaza có chiều dài đủ đã được xác định trong *Nicotiana tabacum* mà được gọi là *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1), *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3), *NtASN3-S* (SEQ ID NO: 9), *NtASN3-T* (SEQ ID NO: 11), *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) và *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7). Các gen *ASN3-S* và *ASN3-T* được phát hiện là chỉ được biểu hiện kém trong quá trình xử lý, trong khi đó, một cách ngạc nhiên đã phát hiện được rằng *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN5-S* và *NtASN5-T* được biểu hiện ở mức độ cao trong quá trình xử lý, ví dụ trong 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 giờ đầu tiên của quá trình xử lý. Thích hợp là, các gen *ASN3-S* hoặc *ASN3-T* hoặc các protein được mã hóa bởi chúng không được sử dụng trong sáng chế. Giảm sự biểu hiện của *NtASN1* và/hoặc *NtASN5* hoặc hoạt tính của (các) protein được mã hóa bởi chúng được thể hiện ở đây để góp phần làm giảm nồng độ asparagin trong lá được xử lý – như lá ở phần thân giữa-dưới được xử lý. Điều này, theo đó, dẫn đến nồng độ acrylamit giảm trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý. Ngược với các kết quả thu được trong US2013/0068240, giảm sự biểu hiện của *NtASN1* hoặc *NtASN5* không chỉ dẫn đến sự giảm asparagin trong lá, nó còn đồng thời dẫn đến sự giảm acrylamit trong sol khí. Sự giảm đồng thời nồng độ asparagin và nồng độ acrylamit này được kèm theo nồng độ nicotin trong lá được xử lý là khoảng bằng, nếu không cao hơn, thực vật đối chứng. Thuận lợi là, các giá trị thấp hơn của sự giảm asparagin là khoảng 89% và sự giảm acrylamit khoảng 70% với về cơ bản là, tác động tối thiểu hoặc không có tác động đến hàm lượng nicotin có thể đạt được trong các phương án nhất định theo sáng chế.

Không mong muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết, ngoài ra, đã xác định được rằng acrylamit được tạo ra trong sol khí thuốc lá phụ thuộc vào tổng lượng asparagin mà được tạo ra trong quá trình xử lý lá. Theo đó, nồng độ acrylamit trong sol khí có thể được điều biến (*ví dụ*, làm giảm) bằng cách giảm tổng lượng asparagin được tạo ra trong quá trình xử lý hoặc làm khô bằng cách điều biến (ví dụ, làm giảm) sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza mà hoạt động trong pha sớm của quá trình xử lý hoặc làm khô. Các thực vật được mô tả mà có hàm lượng asparagin giảm và thể hiện sự biểu hiện hoặc chức năng của asparagin synthetaza giảm. Theo các phương án, điều này đạt được nhờ sử dụng sự cản trở ARN hoặc sự đột biến các trình tự mã hóa asparagin synthetaza được mô tả ở đây mà được biểu hiện trong quá trình xử lý hoặc làm khô. Việc giảm nồng độ asparagin làm giảm lượng acrylamit có trong sol khí. Khi được áp dụng cho thuốc lá, điều này dẫn đến lượng acrylamit có trong sol khí thấp hơn mà được hít vào bởi người

tiêu thụ vật dụng hút thuốc, bao gồm sản phẩm thuốc lá được làm nóng hoặc được đốt cháy. Các ưu điểm khác của sáng chế được mô tả ở đây.

Các khía cạnh và phương án theo sáng chế được đưa ra trong các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó, có sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm, asparagin synthetaza đã nêu gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm: (i) trình tự polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% hoặc ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1 hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7; hoặc (ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i); hoặc (iii) polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 78% với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8; trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii) hoặc (iii) được giảm so với thực vật đối chứng.

Thích hợp là, thực vật này bao gồm ít nhất là một sự thay đổi di truyền trong vùng điều hòa hoặc trong trình tự mã hóa của polynucleotit mã hóa asparagin synthetaza.

Thích hợp là, sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm tạo ra sự giảm nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó so với nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật đối chứng, thích hợp là, trong đó nồng độ asparagin được giảm xuống ít nhất là 17% so với thực vật đối chứng.

Thích hợp là, sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm tạo ra sự giảm nồng độ acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó so với lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật đối chứng, thích hợp là, trong đó nồng độ acrylamit trong sol khí được giảm xuống ít nhất là 20% so với lá được xử lý hoặc làm khô của thực vật đối chứng.

Thích hợp là, nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 22% và lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không

có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 24% lá được xử lý hoặc làm khô và sol khí của thực vật đối chứng; thích hợp là, trong đó nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 44% và lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là 66% so với lá được xử lý hoặc làm khô và sol khí của thực vật đối chứng; thích hợp là, trong đó nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 70% và lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 88% so với lá đã làm khô hoặc sấy khô và sol khí của thực vật đối chứng.

Thích hợp là, nồng độ nicotin trong lá được xử lý hoặc làm khô từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong lá được xử lý hoặc làm khô của thực vật đối chứng.

Thích hợp là, sự tạo ra glutamin, axit aspartic và axit glutamic được gia tăng trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó so với lá được xử lý hoặc làm khô của thực vật đối chứng.

Thích hợp là, thực vật được chọn từ nhóm bao gồm thuốc lá hoặc trà (*Camellia sinensis*).

Thích hợp là, cây thuốc lá này là cây thuốc lá *Nicotiana tabacum*, tốt hơn là, cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* kiểu Burley.

Thích hợp là, thực vật này bao gồm ít nhất là một đột biến trong mỗi bản sao của trình tự polynucleotit mã hóa asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii) hoặc (iii), thích hợp là, (các) đột biến kết thúc và/hoặc (các) mảnh gen mà cản trở sự dịch mã sản phẩm phiên mã ARN mã hóa asparagin synthetaza.

Thích hợp là, trình tự nucleotit asparagin synthetaza bao gồm trình tự nucleotit mã hóa đột biến kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí của trình tự nucleotit mã hóa đột biến kết thúc trong các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc trong đó asparagin synthetaza

bao gồm trình tự nucleotit mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí của codon kết thúc trong các SEQ ID No. 20, 22 và 24.

Thích hợp là, asparagin synthetaza bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự polypeptit đã nêu trong các SEQ ID No. 20, 22 và 24.

Thích hợp là, lượng sinh khối lá từ thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của thực vật về cơ bản là giống như lượng sinh khối lá từ thực vật đối chứng.

Thích hợp là, lá được xử lý trong không khí, thích hợp là, trong đó lá được xử lý trong không khí này được xử lý dưới nắng hoặc được xử lý bằng lửa.

Thích hợp là, lá được xử lý trong không khí, thích hợp là, trong đó lá được xử lý trong không khí được phơi khô hoặc được sấy khô.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất nguyên liệu thực vật hoặc nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô từ thực vật theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm thực vật bao gồm ít nhất là một phần của thực vật hoặc nguyên liệu thực vật theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và các nồng độ của acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ nguyên liệu thực vật đã nêu được giảm so với nguyên liệu thực vật từ thực vật đối chứng, phương pháp đã nêu bao gồm các bước: (a) tạo ra thực vật hoặc bộ phận của nó bao gồm polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% hoặc ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7; (b) giảm sự biểu hiện của polynucleotit hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi chúng trong thực vật hoặc bộ phận của nó; (c) thu hoạch nguyên liệu thực vật từ thực vật hoặc bộ phận của nó; (d) làm khô hoặc xử lý nguyên liệu thực vật; (e) tùy ý là, đo nồng độ của asparagin trong thực vật hoặc bộ phận của nó và/hoặc đo nồng độ của acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này hoặc bộ phận của nó; và (f) thu nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí được chuyển hóa từ đã nêu nguyên liệu thực vật, thích hợp là, trong đó nồng độ nicotin về cơ bản là giống

như nồng độ nicotin in thực vật đối chứng; thích hợp là, trong đó sự tạo raglutamin, axit aspartic và axit glutamic được tăng lên so với lá đã được xử lý hoặc làm khô của thực vật đối chứng.

Thích hợp là, nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô trong ít nhất là khoảng 3 ngày sau khi thu hoạch.

Thích hợp là, nguyên liệu thực vật được xử lý trong không khí, thích hợp là, trong đó lá được xử lý trong không khí được xử lý dưới nắng hoặc được xử lý bằng lửa.

Thích hợp là, nguyên liệu thực vật được hong khô hoặc được phơi khô hoặc được sấy khô .

Sáng chế cũng đề cập đến nguyên liệu thực vật thu được hoặc có thể thu được bởi phương pháp này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định một hoặc nhiều biến đổi di truyền trong thực vật mà tương quan với nồng độ asparagin giảm trong nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô từ thực vật này và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật được xử lý hoặc làm khô hoặc bộ phận của nó so với thực vật đối chứng mà không bao gồm một hoặc nhiều biến đổi di truyền, phương pháp đã nêu bao gồm các bước: (a) xác định thực vật được xử lý hoặc làm khô với nồng độ asparagin giảm trong nguyên liệu thực vật từ thực vật này và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí được chuyển hóa từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô so với nguyên liệu thực vật từ thực vật đối chứng; (b) cung cấp mẫu axit nucleic từ thực vật đã được xác định trong bước (a); và (c) xác định trong mẫu axit nucleic từ bước (b) một hoặc nhiều biến đổi di truyền trong trình tự polynucleotit mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% hoặc ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1 hoặc có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí được chuyển hóa từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô so với thực vật đối chứng, phương pháp đã nêu bao gồm các bước: (a) tạo ra thực vật hoặc nguyên liệu thực vật theo sáng chế; (b) thu hoạch nguyên liệu thực vật từ thực vật này; (c) xử lý hoặc làm khô nguyên liệu thực vật trong một khoảng thời gian; và (d) thu nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô mà có nồng độ asparagin được giảm và nồng độ acrylamit được giảm

trong sol khí được chuyển hóa từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô, thích hợp là, trong đó nồng độ nicotin về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong thực vật đối chứng; thích hợp là, trong đó sự tạo ra glutamin, axit aspartic và axit glutamic được tăng lên so với thực vật đối chứng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất trình tự polynucleotit được phân lập gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% hoặc ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1 hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với các SEQ ID No 19, 21 và 23 với điều kiện là trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với các SEQ ID No 19, 21 và 23 bao gồm trình tự nucleotit mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí của codon kết thúc trong các SEQ ID No. 19, 21 và 23, tốt hơn là trong đó polynucleotit được phân lập đã nêu là polynucleotit tổng hợp hoặc cADN.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập được mã hóa bởi polynucleotit được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 78% với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 24 hoặc gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 78% với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 24 với điều kiện là trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 78% với SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 24 bao gồm codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí của codon kết thúc trong SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO: 22 hoặc SEQ ID NO: 24, tốt hơn là trong đó polynucleotit được phân lập đã nêu là polynucleotit tổng hợp hoặc cADN.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cấu trúc, vectơ hoặc vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit được phân lập được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thực vật chuyển gen hoặc không có trong tự nhiên, tế bào đột biến từ thực vật được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô chứa tế bào được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất sản phẩm thuốc lá hoặc vật dụng hút thuốc chứa nguyên liệu thực vật được mô tả ở đây.

Các tổ hợp của một hoặc nhiều phương án nêu trên cũng được bộc lộ.

Được chứng minh ở đây là asparagin được tạo ra chủ động trong quá trình xử lý. Được chứng minh là sự tích lũy asparagin này dẫn đến sự tạo thành acrylamit trong sol khí được tạo ra khi nguyên liệu thực vật đã được xử lý được làm nóng hoặc đốt cháy. Thuận lợi là, NtASN1-S, NtASN1-T, NtASN5-S và NtASN5-T được biểu hiện ở mức độ cao trong quá trình xử lý, cụ thể là từ sự bắt đầu quá trình xử lý. Giảm sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen này có thể dẫn đến nồng độ acrylamit trong sol khí thấp hơn do nồng độ asparagin có thể được làm giảm thông qua quá trình xử lý.

Đây là tác động giới hạn lên nồng độ nicotin trong các thực vật biến đổi được mô tả ở đây, mà được mong mốn khi các thực vật biến đổi được chủ định để được sử dụng để sản xuất các cây thuốc lá.

Các phương pháp được mô tả ở đây làm thu được một cách ổn định các thực vật, trong đó sự tích lũy asparagin trong quá trình xử lý hoặc làm khô được giảm xuống và sự tạo thành acrylamit trong sol khí cũng được giảm xuống.

Đây là tác động giới hạn lên sinh khối lá và kiểu hình mà là ưu điểm khi sử dụng các thực vật được biến đổi được mô tả ở đây cho các mục đích thương mại.

Sáng chế cho phép các thực vật không được biến đổi di truyền được tạo ra mà có thể là dễ được chấp nhận hơn đối với người tiêu thụ.

Sáng chế không bị giới hạn ở việc sử dụng các thực vật đột biến EMS như trong US2013/0068240. Thực vật đột biến EMS có thể có ít tiềm năng để mang lại các đặc tính được cải thiện cho cây trồng sau khi chọn giống. Một khi quá trình chọn giống được bắt đầu, (các) đặc tính mong muốn của thực vật đột biến EMS có thể bị mất vì các lý do khác nhau. Ví dụ, một số đột biến có thể là cần thiết, đột biến có thể là trội hoặc lặn, và sự xác định đột biến điểm trong gen đích có thể là khó để đạt được. Ngược lại, sáng chế khai thác việc sử dụng các gen nhất định mà có thể được điều khiển và/hoặc bị bất hoạt cách đặc hiệu để tạo ra các thực vật với kiểu hình mong muốn. Sáng chế có thể được áp dụng cho các giống thuốc lá hoặc cây trồng khác, do đó mang lại giải pháp mong muốn để giảm ít nhất là acrylamit.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện hàm lượng aspartat (Asp), glutamin (Glu), asparagin (Asn) và tổng hàm lượng axit amin (aa) tự do trong 3 dòng thuốc lá Burley khác nhau được canh tác trên cùng một cánh đồng (trung bình là 5 ô lặp) và được làm khô đồng thời. Ba dòng Burley là TN90 (A), Banket A1 (B) và Kentucky 14 (C).

Fig. 2 thể hiện thời gian-chiều hướng của sự biến đổi asparagin, glutamin và aspartat trong quá trình xử lý lá Burley.

Fig. 3 thể hiện quá trình hoạt động của asparagin synthetaza.

Fig. 4 thể hiện mối tương quan, tồn tại giữa sự có mặt của asparagin trong các loại thuốc lá riêng lẻ, Virginia (FC), Oriental (OR), Kasturi (KS) hoặc Burley (BU) và loại trộn bao gồm hỗn hợp gồm Virginia (FC), Kasturi (KS), và Oriental (OR) (được gọi là RRP).

Fig. 5 thể hiện các kết quả thu được khi Swiss Burley Stella được trồng ở Thụy Sĩ và được xử lý trong kho xử lý trong không khí trong 10 tuần (cách làm thông thường nông nghiệp cổ điển, BU-AC) hoặc trong lò xử lý bằng không khí nóng, giống hệt như dòng thuốc lá Swiss Virginia (BU-FC). Sau khi xử lý, phiến lá được nghiền và trở thành đối tượng để xác định asparagin (A). Bột được đồng nhất của nguyên liệu thuốc lá (ít hơn hoặc bằng 200 micron) được tạo ra. Nguyên liệu thuốc lá được đồng nhất này được sử dụng trong vật tạo ra sol khí về cơ bản là như được mô tả trong WO2013098405 để sử dụng với thiết bị tạo sol khí. Vật tạo ra sol khí được tiêu thụ bằng cách sử dụng chế độ hút thuốc y tế Canada để xác định hàm lượng của acrylamit trong sol khí (B).

Fig. 6 thể hiện cây phát sinh loài của các trình tự axit amin được suy luận từ các gen của cây thuốc lá tương ứng với NtASN1-S, NtASN1-T, NtASN3-S, NtASN3-T, NtASN5-S, NtASN5-T so với các protein Arabidopsis AtASN1 (At3g47340), AtASN2 (At5g65010) và AtASN3 (At5g10240) và các protein của cây cà chua Solyc06g007180 và Solyc04g055200.

Fig. 7 thể hiện sự biểu hiện của các gen *ASN* trong quá trình xử lý dòng thuốc lá Swiss Burley (Stella) được trồng ở Thụy Sĩ năm 2010. ARN được phân lập từ các mẫu lá (vị trí giữa thân) được thu theo cách thời gian-chiều hướng trên cánh đồng (-4 giờ) và trong các kho xử lý trong không khí cho đến 96 giờ xử lý. Biểu hiện gen trên các mẫu

dò đặc hiệu được xác định bằng cách sử dụng các phân tích với các chip Affymetrix Tobarray.

Fig. 8 thể hiện sự biểu hiện của các gen *ASN* trong giống thuốc lá Swiss Burley (Stella, A & C) và Swiss Virginia (Bright, ITB 683, B & D) sau khi làm khô 48 giờ.

Fig. 9 thể hiện sự biểu hiện sau khi thu hoạch của *ASN1*, *ASN5* (A) và *ASN3* (B) sau 60 giờ của quá trình xử lý trong không khí trong 4 loại lá Burley khác nhau (vị trí thân dưới) được trồng ở cánh đồng Payerne năm 2013.

Fig. 10 thể hiện sự biểu hiện của *ASN1*, *ASN5* (bảng bên trái) và *ASN3* (bảng bên phải) trong 8 mô được thu từ cây thuốc lá Burley trường thành được trồng trên cánh đồng (hoa chưa trường thành, Im_flower; lá ở dưới, _LS, lá ở giữa,_MS và lá ở trên, _US, các vị trí lá từ thân; cánh hoa, rễ, đài hoa và thân).

Fig. 11 thể hiện hàm lượng asparagin trong các thực vật ASN1-ARNi được trồng trong nhà kính dưới sự điều khiển của promotơ MMV hoặc E4 và mức độ phiên mã *ASN1* được xác định sau 3 ngày của quá trình xử lý. Lượng asparagin được đo ở các vị trí lá ở phần thân giữa-dưới từ 15 thực vật của mỗi sự kiến biến nạp (A). Sự biểu hiện tương đối của sản phẩm phiên mã *ASN1* được ước tính bởi qPCR sử dụng ARN được thu sau 3 ngày của quá trình xử lý trong 15 cây từ mỗi sự kiến biến nạp (B).

Fig. 12 thể hiện hàm lượng glutamin, aspartat, glutamat và nicotin trong các thực vật ASN1-ARNi được trồng trong nhà kính dưới sự điều khiển của promotơ MMV hoặc E4. Lượng Gln (A), Asp (B), Glu (C) và nicotin (D) được đo ở các vị trí lá ở phần thân giữa-dưới từ 15 cây của mỗi sự kiến biến nạp.

Fig. 13 thể hiện hàm lượng asparagin trong các thực vật ASN5-ARNi được trồng trong nhà kính dưới sự điều khiển của promotơ MMV hoặc E4 và nồng độ của sản phẩm phiên mã *ASN5* được xác định sau 3 ngày của quá trình xử lý. Lượng asparagin được đo ở các vị trí lá ở phần thân giữa-dưới từ 15 thực vật của mỗi sự kiến biến nạp (A). Sự biểu hiện tương đối của *ASN5* sản phẩm phiên mã được ước tính bởi qPCR sử dụng ARN được thu sau 3 ngày của quá trình xử lý trong 15 thực vật từ mỗi sự kiện biến nạp (B).

Fig. 14 thể hiện hàm lượng glutamin, aspartat, glutamat và nicotin trong các thực vật ASN5-ARNi được trồng trong nhà kính dưới sự điều khiển của các promotơ MMV hoặc E4. Lượng Gln (A), Asp (B), Glu (C) và nicotin (D) được đo ở các vị trí lá ở phần thân giữa-dưới từ 15 cây của mỗi sự kiến biến nạp.

Fig. 15 thể hiện sinh khối lá của các dòng ASN1-ARNi và ASN5-ARNi. Bốn lá được thu ở vị trí giữa thân từ 4 cây của mỗi sự kiện biến nạp, được chọn ngẫu nhiên và được cân. Khối lượng trung bình và độ lệch chuẩn được thể hiện.

Fig. 16 thể hiện sự biểu hiện của *CYP82E4* trong các bước ban đầu của quá trình làm khô bằng không khí Swiss Burley (Stella). Các sản phẩm phiên mã được xác định sử dụng các chip Tobarray Affymetrix dựa vào đoạn dò đặc hiệu NtPMIa1g2e2_st đối với monooxygenaza CYP82E4 của xytocrom P450.

Fig.17 thể hiện tỷ lệ phần trăm giảm asparagin ở các biến thể ASN. Các trị số tỷ lệ phần trăm được tính toán so với các cụm không phân ly WT đối với mỗi dòng đột biến.

Fig.18 thể hiện sinh khối của lá được sấy khô (4) được thu hoạch ở vị trí thân giữa-dưới.

Fig.19 thể hiện sự xác định acrylamit trong sol khí được tạo ra từ việc làm nóng vật tạo sol khí, như được mô tả trong WO2013/098405, được tạo ra từ ASN1-ARNi, ASN5-ARNi và các lá đối chứng tương ứng của chúng. Asparagin được xác định trong bột mịn từ ASN1-ARNi, ASN5-ARNi và các lá đối chứng (xem Fig.11 và Fig.13) sau khi trộn với 50% thuốc lá Virginia (A, C).Fig. 11Fig. 13 Hỗn hợp thuốc lá trộn được chuyển dạng trong lá đúc và được làm nóng bên trong vật tạo sol khí. Sau đó, acrylamit được xác định trong sol khí (B, D).

Fig.20 thể hiện sự xác định acrylamit trong khói của điếu thuốc lá dễ cháy được tạo ra từ điếu thuốc được cắt đầu lọc chứa ASN1-ARNi và phiến lá từ giữa-thân đối chứng tương ứng của chúng. Asparagin (bảng A) được xác định trong điếu thuốc được cắt đầu lọc được bào chế từ ASN1-ARNi và các lá đối chứng. Các điếu thuốc lá dễ cháy được dùng và acrylamit được phân tích trong khói thuốc.

Fig.21 thể hiện sự xác định acrylamit trong sol khí từ vật tạo ra sol khí được tạo ra từ các lá mang đột biến kết thúc ASN1-S và các lá đối chứng (các cụm không phân ly WT). Asparagin được xác định trong bột mịn từ các lá mang đột biến kết thúc ASN1-S và các lá đối chứng sau khi trộn với 50% thuốc lá Virginia (A). Hỗn hợp thuốc lá trộn được chuyển dạng thành lá đúc và sol khí được tạo ra từ vật tạo sol khí. Sau đó, acrylamit trong sol khí được xác định (B).

Fig.22 thể hiện các ví dụ về các vectơ được sử dụng để tạo ra các thực vật ASN-ARNi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Các thuật ngữ và từ ngữ kỹ thuật được sử dụng bên trong phạm vi của đơn sáng chế, nói chung là được đưa ra với ý nghĩa được áp dụng phổ biến đối với chúng trong lĩnh vực kỹ thuật thích hợp gồm thực vật và sinh học phân tử. Tất cả các định nghĩa về thuật ngữ sau áp dụng với toàn bộ nội dung của đơn sáng chế này. Từ "bao gồm" không loại trừ các thành phần hoặc các bước khác, và mạo từ không xác định chỉ số ít không loại trừ số nhiều. Một bước duy nhất có thể đáp ứng đủ các chức năng của một số dấu hiệu kỹ thuật được nêu trong các yêu cầu bảo hộ. Các thuật ngữ "khoảng", "về cơ bản là" và "xấp xỉ là" khi dùng đối với trị số hoặc khoảng số cụ thể để chỉ trị số hoặc khoảng mà là trong vòng 20%, trong vòng 10%, hoặc trong vòng 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% của trị số hoặc khoảng số cụ thể này.

Thuật ngữ "được phân lập" dùng để chỉ bất kỳ thực thể nào mà được lấy từ môi trường tồn tại tự nhiên của nó, nhưng thuật ngữ này không có ý đề cập đến bất kỳ mức độ tinh sạch nào.

"Vectơ biểu hiện" là vật vận chuyển axit nucleic mà bao gồm một tổ hợp của các thành phần axit nucleic để cho phép sự biểu hiện của axit nucleic. Các vectơ biểu hiện thích hợp bao gồm các episom có khả năng sao chép ngoài nhiễm sắc thể như các plasmit axit nucleic mạch đôi, vòng; các plasmit axit nucleic mạch đôi được chuyển thành dạng thẳng; và bất kỳ vectơ biểu hiện nào khác tương đương về chức năng mà có nguồn gốc bất kỳ. Vectơ biểu hiện bao gồm ít nhất là promotơ được đặt ở phía trước và liên kết có thể điều khiển được với axit nucleic, các cấu trúc axit nucleic hoặc thể liên hợp axit nucleic, như được định nghĩa dưới đây.

Thuật ngữ "cấu trúc" dùng để chỉ mảnh axit nucleic tái tổ hợp, mạch đôi bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit. Cấu trúc bao gồm "mạch khuôn" bắt cặp bazơ với "mạch mã hóa hoặc có nghĩa" bổ sung. Cấu trúc cụ thể có thể được chèn vào vectơ theo hai hướng có thể, theo cùng hướng (hoặc có nghĩa) hoặc hướng ngược lại (hoặc đối nghĩa) xét theo hướng của promotơ được đặt bên trong vectơ – như vectơ biểu hiện.

"Vectơ" dùng để chỉ vật vận chuyển axit mà bao gồm tổ hợp của các thành phần axit nucleic để cho phép vận chuyển axit nucleic, các cấu trúc axit nucleic và các thể liên hợp axit nucleic và tương tự. Các vectơ thích hợp bao gồm các episom có khả năng

sao chép ngoài nhiễm sắc thể như các plasmit axit nucleic mạch đôi, vòng; các plasmit axit nucleic mạch đôi được chuyển thành dạng thẳng; và bất kỳ vectơ nào khác có nguồn gốc bất kỳ.

"Promotơ" dùng để chỉ trình tự/ phần tử axit nucleic, thường là được đặt ở phía trước và liên kết có thể điều khiển được với mảnh ADN mạch đôi. Các promotơ có thể chuyển hóa toàn bộ từ các vùng gần nhất với gen quan tâm nguyên bản, hoặc có thể bao gồm các thành phần khác được chuyển hóa từ các promotơ nguyên bản hoặc các đoạn ADN tổng hợp khác.

Các thuật ngữ "tương đồng", "giống hệt" hoặc "giống" dùng để chỉ mức độ giống nhau về trình tự giữa hai phân tử polypeptit hoặc giữa hai phân tử axit nucleic được so sánh bởi phép sắp hàng trình tự. Mức độ tương đồng giữa hai trình tự axit nucleic riêng mà được so sánh là một hàm về số lượng các nucleotit giống, hoặc trùng khớp ở các vị trí có thể so sánh được. Phần trăm tương đồng có thể được xác định bằng cách kiểm tra trực quan và bằng cách tính toán. Ngoài ra, phần trăm tương đồng của hai trình tự axit nucleic có thể được xác định bằng cách so sánh thông tin trình tự mà sử dụng chương trình máy tính như - ClustalW, BLAST, FASTA hoặc Smith-Waterman. Phần trăm tương đồng đối với hai trình tự có thể có các trị số khác nhau phụ thuộc vào: (i) phương pháp được sử dụng để sắp hàng các trình tự, ví dụ, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (được thực hiện trong các chương trình khác nhau), hoặc phép sắp hàng về cấu trúc từ phép so sánh 3D; và (ii) các tham số được sử dụng bởi phương pháp sắp hàng, ví dụ, phép sắp hàng cục bộ với phép sắp hàng toàn bộ, ma trận được sử dụng để tính điểm đối với cặp (ví dụ, BLOSUM62, PAM250, Gonnet v.v.), và điểm trừ cho mỗi khoảng trống, ví dụ, dạng hàm số và các hằng số. Khi đã thực hiện phép sắp hàng, có nhiều cách khác nhau để tính phần trăm tương đồng giữa hai trình tự. Ví dụ, phần trăm tương đồng giữa hai trình tự có thể chia số lượng giống nhau cho: (i) độ dài của trình tự ngắn nhất; (ii) độ dài của phép sắp hàng; (iii) độ dài trung bình của trình tự; (iv) số lượng các vị trí không trống; hoặc (iv) số lượng các vị trí tương đương không bao gồm các phần nhô ra. Ngoài ra, sẽ được hiểu rõ rằng phần trăm tương đồng cũng phụ thuộc nhiều vào độ dài. Do đó, cặp trình tự càng ngắn, độ tương đồng trình tự giữa chúng càng cao có thể dự đoán là có thể xảy ra. Chương trình đa sắp hàng trình tự phổ biến ClustalW (Nucleic Acids Research (1994) 22, 4673-4680; Nucleic Acids Research (1997), 24, 4876-4882) là cách thích hợp để tạo ra nhiều sự sắp hàng các polypeptit hoặc các

polynucleotit. Các tham số thích hợp đối với ClustalW có thể là như sau: Đối với các phép sắp hàng cho polynucleotit: Điểm trừ với khoảng trống = 15,0, Điểm trừ đối với sự kéo dài khoảng trống = 6,66, và Ma trận = Identity. Đối với các phép sắp hàng cho polypeptit: Điểm trừ với khoảng trống = 10,0, Điểm trừ đối với sự kéo dài khoảng trống = 0,2, và Ma trận = Gonnet. Đối với các phép sắp hàng giữa ADN và Protein: ENDGAP = -1, và GAPDIST = 4. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng có thể cần thiết phải thay đổi các tham số này và các tham số khác cho phép sắp hàng trình tự tối ưu. Thích hợp là, sau đó, sự tính toán phần trăm tương đồng được thực hiện từ phép sắp hàng (N/T), trong đó N là số vị trí mà các trình tự có gốc giống nhau, và T là tổng số vị trí được so sánh bao gồm cả khoảng trống nhưng trừ các gốc nhô ra.

"Biến thể" có nghĩa là trình tự về cơ bản là giống. Biến thể có thể có chức năng giống hoặc chức năng về cơ bản là giống như trình tự kiểu dại. Đối với asparagin synthetaza, chức năng tương tự là ít nhất là khoảng 50%, 60%, 70%, 80% hoặc 90% chức năng của enzym kiểu dại để chuyển hóa aspartat thành asparagintrong các điều kiện giống nhau. Đối với asparagin synthetaza, chức năng tương tự là ít nhất là khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% chức năng của enzym kiểu dại để chuyển hóa aspartat thành asparagin trong các điều kiện giống nhau. Các biến thể có thể có một hoặc nhiều đột biến ưu thế mà dẫn đến enzym có mức độ hoạt tính của asparagin synthetaza giảm so với polypeptit kiểu dại. Các biến thể có thể có một hoặc nhiều đột biến ưu thế mà dẫn đến hoạt tính asparagin synthetaza của chúng bị bất hoạt (tức là, ức chế 100%, và như vậy polypeptit không có chức năng). Một biến thể làm ví dụ của ASN1-S kiểu dại là ASN1-S_W156* (các SEQ ID No 19 và 20) mà có đột biến kết thúc ưu thế mà dẫn đến khoảng sự giảm asparagin 17% so với polypeptit ASN1-S kiểu dại. Một biến thể làm ví dụ của ASN1-T kiểu dại là ASN1-T_W156* (các SEQ ID No 21 và 22) mà có đột biến kết thúc ưu thế mà dẫn đến khoảng sự giảm asparagin 83% so với polypeptit ASN1-S kiểu dại. Một biến thể làm ví dụ của ASN5-S kiểu dại là ASN5-S_W66* (các SEQ ID No 23 và 24) mà có đột biến kết thúc ưu thế mà dẫn đến khoảng sự giảm asparagin 44% so với polypeptit ASN1-S kiểu dại.

Thuật ngữ "thực vật" dùng để chỉ bất kỳ thực vật nào hoặc bộ phận của thực vật ở bất kỳ giai đoạn nào của chu kỳ sống hoặc phát triển của nó, và các thế hệ sau của nó. Theo một phương án, thực vật là "cây thuốc lá", mà dùng để chỉ thực vật thuộc chi Nicotiana. Các loài được ưu tiên của cây thuốc lá được mô tả ở đây. Thích hợp là, thực

vật là thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến trong đó sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều protein được điều biến so với thực vật đối chứng. Thích hợp là, sự thay đổi mà tạo ra thực vật, thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến dẫn đến sự điều biến biểu hiện của một hoặc nhiều gen hoặc sự điều biến hoạt tính của một hoặc nhiều protein. Theo các phương án nhất định, sự thay đổi này là sự thay đổi di truyền hoặc sự cải biến di truyền.

"Các bộ phận của thực vật" bao gồm các tế bào thực vật, các tế bào trần thực vật, mô tế bào thực vật nuôi cấy từ cái mà toàn bộ thực vật có thể được tái sinh, mô sẹo thực vật, cụm tế bào thực vật và các tế bào thực vật mà nguyên vẹn trong thực vật hoặc các bộ phận của thực vật như phôi, hạt phấn, bao phấn, noãn, hạt, lá hoa, thân, cành, quả, rễ, đầu rễ và tương tự. Thế hệ sau, các biến thể và các thể đột biến của thực vật được tái tạo cũng nằm trong phạm vi sáng chế, với điều kiện là chúng bao gồm các polynucleotit đã đưa vào được mô tả ở đây. Lá của thực vật được ưu tiên đặc biệt để sử dụng trong sáng chế.

"Tế bào thực vật" dùng để chỉ đơn vị về cấu trúc và sinh lý của thực vật. Tế bào thực vật có thể ở dạng tế bào trần mà không có thành tế bào, đơn bào được phân lập hoặc tế bào được nuôi cấy, hoặc như một phần của đơn vị có tổ chức cao hơn như là, nhưng không chỉ giới hạn ở, mô thực vật, cơ quan thực vật, hoặc toàn bộ thực vật.

Thuật ngữ "nguyên liệu thực vật" dùng để chỉ bất kỳ chế phẩm dạng rắn, lỏng hoặc khí nào, hoặc tổ hợp của chúng, có thể thu được từ thực vật, bao gồm sinh khối, lá, thân, rễ, hoa hoặc các bộ phận của hoa, quả, hạt phấn, tế bào trứng, hợp tử, hạt, phần cắt, dịch tiết, dịch chiết, dịch nuôi cấy tế bào hoặc dịch nuôi cấy mô, hoặc bất kỳ bộ phận hoặc sản phẩm nào của thực vật. Theo một phương án, nguyên liệu thực vật bao gồm hoặc gồm có sinh khối, thân, hạt hoặc lá. Theo một phương án khác, nguyên liệu thực vật bao gồm hoặc gồm có lá.

Thuật ngữ "giống" dùng để chỉ một quần thể thực vật mà cùng các đặc tính cố định giống nhau mà phân biệt chúng với các thực vật khác cùng loài. Trong khi sở hữu một hoặc nhiều tính trạng khác biệt, giống còn khác biệt bởi sự biến đổi toàn bộ rất nhỏ giữa các cá thể thuộc giống đó. Giống thường được bán thương mại.

Thuật ngữ "dòng" hoặc “dòng cho chọn giống” khi được sử dụng ở đây dùng để chỉ một nhóm thực vật mà được sử dụng trong quá trình chọn giống thực vật. Dòng có thể phân biệt được với giống do nó thể hiện sự thay đổi nhỏ giữa các cá thể đối với một

hoặc nhiều tính trạng quan tâm, mặc dù có thể là có một số thay đổi giữa các cá thể đối với các tính trạng khác.

Thuật ngữ 'xuất hiện một cách không tự nhiên' khi được sử dụng ở đây mô tả một thực thể (ví dụ, polynucleotit, đột biến di truyền, thực vật, và tế bào thực vật và nguyên liệu thực vật) mà không được tạo ra bởi tự nhiên hoặc không tồn tại trong tự nhiên. Các thực thể hoặc các thực thể nhân tạo xuất hiện một cách không tự nhiên có thể được tạo ra, được tổng hợp, được bắt đầu, được biến đổi, được can thiệp, hoặc được xử lý bằng các phương pháp được mô tả ở đây hoặc các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Các thực thể hoặc các thực thể nhân tạo xuất hiện một cách không tự nhiên có thể được tạo ra, được tổng hợp, được bắt đầu, được biến đổi, được can thiệp, hoặc được xử lý bởi con người. Do đó, bằng cách ví dụ, thực vật xuất hiện một cách không tự nhiên, tế bào thực vật xuất hiện một cách không tự nhiên hoặc nguyên liệu thực vật xuất hiện một cách không tự nhiên có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật thao tác di truyền- như ARN đối nghĩa, ARN can thiệp, meganucleaza và tương tự. Theo ví dụ khác, thực vật xuất hiện một cách không tự nhiên, tế bào thực vật xuất hiện một cách không tự nhiên hoặc nguyên liệu thực vật xuất hiện một cách không tự nhiên có thể được tạo ra bằng cách chuyển gen vào cá thể khác hoặc bằng cách chuyển một hoặc nhiều đột biến di truyền (ví dụ một hoặc nhiều dạng đa hình) từ thực vật hoặc tế bào thực vật thứ nhất vào thực vật hoặc tế bào thực vật thứ hai (mà có thể là xuất hiện tự nhiên), sao cho thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật thu được hoặc thế hệ sau của chúng bao gồm cơ cấu di truyền (ví dụ, hệ gen, nhiễm sắc thể hoặc đoạn của chúng) mà không được tạo ra theo tự nhiên hoặc không tồn tại trong tự nhiên. Thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật thu được, do đó, là nhân tạo hoặc xuất hiện một cách không tự nhiên. Theo đó, thực vật hoặc tế bào thực vật nhân tạo hoặc xuất hiện một cách không tự nhiên có thể được tạo ra bằng cách thay đổi trình tự di truyền trong thực vật hoặc tế bào thực vật xuất hiện tự nhiên thứ nhất, ngay cả khi trình tự di truyền thu được xuất hiện tự nhiên trong thực vật hoặc tế bào thực vật thứ hai mà bao gồm nền tảng di truyền khác với thực vật hoặc tế bào thực vật thứ nhất.

Thuật ngữ "điều biến" có thể dùng để chỉ việc giảm, ức chế, tăng hoặc ngoài ra, ảnh hưởng đến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của polypeptit. Thuật ngữ này có thể còn dùng để chỉ việc giảm, ức chế, tăng hoặc ngoài ra, ảnh hưởng đến sự biểu hiện hoặc hoạt

tính của gen mã hóa polypeptit mà có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, điều biến hoạt động phiên mã.

Thuật ngữ "giảm" hoặc "được giảm" khi được sử dụng ở đây, dùng để chỉ sự giảm từ khoảng 10% đến khoảng 99%, hoặc sự giảm ít nhất là 10%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 100% hoặc nhiều hơn về lượng hoặc hoạt tính, như là, nhưng không chỉ giới hạn ở hoạt tính của polypeptit, hoạt động phiên mã và biểu hiện protein.

Thuật ngữ "ức chế" hoặc "bị ức chế" khi được sử dụng ở đây, dùng để chỉ sự giảm từ khoảng 98% đến khoảng 100%, hoặc sự giảm ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, nhưng cụ thể là 100%, lượng hoặc hoạt tính, như nhưng không chỉ giới hạn ở hoạt tính của polypeptit, hoạt động phiên mã và biểu hiện protein.

Sự biến nạp tế bào có thể là ổn định hoặc tạm thời. Thuật ngữ "biến nạp tạm thời" hoặc "được biến nạp tạm thời" hoặc các biến thể của chúng dùng để chỉ sự đưa vào một hoặc nhiều polynucleotit ngoại gen vào một tế bào khi vắng mặt sự cài polynucleotit ngoại gen vào hệ gen của tế bào chủ. Ngược lại, thuật ngữ "biến nạp ổn định" hoặc "được biến nạp ổn định" dùng để chỉ sự đưa vào và cài một hoặc nhiều polynucleotit ngoại gen vào hệ gen của tế bào. Thuật ngữ "thể biến nạp ổn định" dùng để chỉ một tế bào mà được cài một cách ổn định một hoặc nhiều polynucleotit ngoại gen vào ADN hệ gen hoặc ADN của cơ quan tử. Sẽ được hiểu là sinh vật hoặc tế bào của nó được biến nạp các axit nucleic, cấu trúc và/hoặc vectơ theo sáng chế có thể được biến nạp tạm thời hoặc được biến nạp ổn định. Theo các phương án nhất định, biến nạp ổn định được ưu tiên.

Thuật ngữ "tăng" hoặc "được tăng" khi được sử dụng ở đây, dùng để chỉ sự giảm từ khoảng 5% đến khoảng 99%, hoặc sự tăng ít nhất là 5%, ít nhất là 10%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, ít nhất là 99%, hoặc ít nhất là 100% hoặc nhiều hơn về lượng hoặc hoạt tính, như là, nhưng không chỉ giới hạn ở hoạt tính của polypeptit, hoạt động phiên mã và biểu hiện protein.

Thuật ngữ "về cơ bản là" khi được sử dụng ở đây và khi được sử dụng trong trường hợp về lượng có nghĩa là lượng này bằng ít nhất là khoảng 10%, ít nhất là khoảng 9%, ít nhất là khoảng 8%, ít nhất là khoảng 7%, ít nhất là khoảng 6%, ít nhất là khoảng

5%, ít nhất là khoảng 4%, ít nhất là khoảng 3%, ít nhất là khoảng 2%, ít nhất là khoảng 1%, hoặc ít nhất là khoảng 0,1% lượng mà đang được so sánh với.

Thuật ngữ "đối chứng" trong trường hợp của thực vật đối chứng hoặc tế bào thực vật đối chứng và tương tự có nghĩa là thực vật hoặc tế bào thực vật, trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của gen hoặc protein quan tâm không bị điều biến và vì thế nó có thể cung cấp sự so sánh hoặc đối chiếu với thực vật hoặc tế bào thực vật trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của enzym đã được thay đổi. Do đó, trong ngữ cảnh của sáng chế, đối chứng sẽ không bao gồm ít nhất là một sự thay đổi di truyền mà giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza. Thực vật đối chứng hoặc tế bào thực vật đối chứng có thể bao gồm vectơ trống. Thực vật đối chứng hoặc tế bào thực vật đối chứng có thể tương ứng với thực vật kiểu dại hoặc tế bào thực vật kiểu dại và tương tự. Trong tất cả các trường hợp này, thực vật làm đối tượng và thực vật đối chứng được nuôi trồng và được thu hoặc mà sử dụng cùng một quy trình vì mục đích so sánh. Các thay đổi về mức độ, tỷ lệ, hoạt động, hoặc sự phân bố của các gen hoặc polypeptit được mô tả ở đây, hoặc các thay đổi về kiểu hình của thực vật, cụ thể là sự tích lũy asparagin giảm và/hoặc sự tích lũy acrylamit giảm và/hoặc sự tích lũy glutamin tăng, và/hoặc sự tích lũy axit aspartic tăng và/hoặc sự tích lũy axit glutamic tăng có thể được đo bằng cách so sánh thực vật làm đối tượng với thực vật đối chứng, thích hợp là, trong đó thực vật làm đối tượng và thực vật đối chứng đã được nuôi trồng và/hoặc thu hoạch mà sử dụng các quy trình giống nhau. Thực vật đối chứng có thể cung cấp điểm đối chiếu để đo các thay đổi về kiểu hình của thực vật làm đối tượng. Phép đo các thay đổi về kiểu hình có thể được đo ở bất kỳ thời điểm nào của thực vật, bao gồm, trong quá trình phát triển, già hóa của thực vật, hoặc sau khi làm khô. Phép đo các thay đổi về kiểu hình có thể được đo trong thực vật đã sinh trưởng trong bất kỳ điều kiện nào, bao gồm từ các thực vật được sinh trưởng trong phòng tăng trưởng, nhà kính hoặc trên cánh đồng. Các thay đổi về kiểu hình có thể được đo bằng cách đo hàm lượng asparagin và/hoặc hàm lượng glutamin và/hoặc hàm lượng axit aspartic và/hoặc hàm lượng axit glutamic (như được mô tả trong Moldoveanu (2005)) và/hoặc hàm lượng acrylamit(như được mô tả trong Papousek *et al.*, 2014 và/hoặc Onoa *et al.*, 2003 và/hoặc United States Environmental Protection Agency Method 8032A – Acrylamide by Gas Chromatography, tái bản lần 1, tháng 12 năm 1996 và/hoặc hàm lượng nicotin (sử dụng Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco Recommended (CORESTA) Method Number

62, Determination of nicotine in tobacco and tobacco products by gas chromatographic analysis (tháng 2 năm 2005)) có thể được theo dõi trước và/hoặc trong và/hoặc sau quá trình làm khô hoặc sấy khô mà sử dụng các phương pháp mà đã được biết rõ các phương pháp mà đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Các phân tích axit amin tự do được thực hiện mà sử dụng phương pháp được phỏng theo Moldoveanu (2005).

Các khía cạnh và các phương án theo sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự với trình tự bất kỳ trong số các trình tự được mô tả ở đây, bao gồm bất kỳ polynucleotit nào được thể hiện trong danh mục trình tự ít nhất là 60%. Thích hợp là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với nó ít nhất là 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%. Thích hợp hơn là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với nó ít nhất là 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%. Các phép sắp hàng các trình tự được mô tả ở đây được thể hiện trong bảng 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là 60%. Thích hợp là, polynucleotit SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 78% 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%. Thích hợp hơn là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là 72%, 73%, 74%, 75%,

78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Thích hợp hơn là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Thích hợp hơn là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là 60%, với điều kiện là polynucleotit được phân lập đã nêu bao gồm đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23.

Thích hợp là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 78% 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%. Thích hợp hơn là, polynucleotit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự polynucleotit có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự polynucleotit có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID

NO:21 hoặc SEQ ID NO:23, với điều kiện là polynucleotit được phân lập đã nêu bao gồm đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các biến thể polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự với trình tự SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%. Thích hợp là, sáng chế đề xuất các biến thể polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự với trình tự SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%.

Thích hợp là, sáng chế đề xuất các biến thể polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự với trình tự SEQ ID NO:1 ít nhất là khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%.

Thích hợp là, sáng chế đề xuất các biến thể polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự với trình tự SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các biến thể polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự với trình tự SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%, với điều kiện là các biến thể polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23. Thích hợp là, sáng chế đề xuất các biến thể polynucleotit mà có độ tương đồng trình tự với trình tự SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID

NO:23 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%, với điều kiện là đã nêu các biến thể polynucleotit chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các mảnh có trình tự SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 78%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các mảnh có trình tự SEQ ID NO:1 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:1 ít nhất là khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các mảnh SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 78%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%.

Thích hợp là, sáng chế đề xuất các mảnh của các biến thể polynucleotit có trình tự SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ

ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%.

Thích hợp là, sáng chế đề xuất các mảnh của các biến thể polynucleotit SEQ ID NO:1 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:1 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%.

Thích hợp là, sáng chế đề xuất các mảnh của các biến thể polynucleotit có trình tự SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit các mảnh của SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó, mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 78%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%, với điều kiện là các mảnh đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23. Thích hợp là, sáng chế đề xuất các mảnh của các biến thể polynucleotit có trình tự SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 có độ tương đồng đáng kể (tức là, sự giống nhau giữa các trình tự) hoặc độ giống nhau đáng kể với nó mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là khoảng 72%, 73%, 74%, 75%, 78%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%,

98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% hoặc 99,9%, với điều kiện là các mảnh đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các polynucleotit bao gồm mức độ giống nhau hoặc tương đồng đủ hoặc đáng kể với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 hoặc SEQ ID NO:9 hoặc SEQ ID NO:11 mà mã hóa polypeptit mà có chức năng làm asparagin synthetaza. Thích hợp là, (các) polynucleotit được mô tả ở đây mã hóa protein có hoạt tính asparagin synthetaza mà bằng ít nhất là khoảng 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% hoặc hơn hoạt tính của protein được nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12. Để xác định liệu một polypeptit có là asparagin synthetaza có chức năng, thử nghiệm được mô tả bởi Romagni & Dayan (2000) *J Agric Food Chem*. May;48(5):1692-6 có thể được sử dụng. Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các polynucleotit bao gồm mức độ giống nhau hoặc tương đồng đủ hoặc đáng kể với SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 mà mã hóa polypeptit mà có chức năng làm asparagin synthetaza, với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23. Thích hợp là, (các) polynucleotit được mô tả ở đây mã hóa protein có hoạt tính asparagin synthetaza bằng ít nhất là khoảng 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% hoặc hơn hoạt tính của protein đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng

trình tự với SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:3 ít nhất là 72%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90% và độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 ít nhất là 72%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:7 được điều biến. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:5 và/hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90% và độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:5 và/hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 và/hoặc SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được

điều biến. Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90% và độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 và SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:21 và SEQ ID NO:23 ít nhất là 72%, được điều biến, với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là 72%, được điều biến với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 hoặc SEQ ID NO:21 hoặc SEQ ID NO:23.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:21 ít nhất là 72%, được điều biến với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:21.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:21 và SEQ ID NO:23 ít nhất là 72%, được điều biến, với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:21 và SEQ ID NO:23.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:21 và/hoặc SEQ ID NO:23 ít nhất là 72%, được điều biến với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:21 và SEQ ID NO:23.

Theo các phương án nhất định, sự biểu hiện của polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:19 và/hoặc SEQ ID NO:21 và SEQ ID NO:23 ít nhất là 72%, được điều biến với điều kiện là các polynucleotit đã nêu chứa đột biến mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:21 và SEQ ID NO:23.

Polynucleotit khi được mô tả ở đây có thể bao gồm polyme của nucleotit, mà có thể là axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc axit ribonucleic (ARN) được thay đổi hoặc không được thay đổi. Theo đó, polynucleotit có thể là, mà không có giới hạn, ADN hệ gen, ADN bổ sung (cADN), mARN, hoặc ARN đối nghĩa hoặc (các) mảnh của chúng. Ngoài ra, polynucleotit có thể là ADN mạch đơn hoặc mạch đôi, ADN mà là hỗn hợp gồm các vùng mạch đơn và mạch đôi, phân tử lai bao gồm ADN và ARN, hoặc phân tử lai với hỗn hợp gồm các vùng mạch đơn và mạch đôi hoặc (các) mảnh của chúng. Ngoài ra, polynucleotit có thể bao gồm các vùng mạch ba bao gồm ADN, ARN, hoặc cả hai hoặc (các) mảnh của chúng. Polynucleotit có thể chứa một hoặc nhiều bazơ được cải biến, như phosphothioat, và có thể là axit nucleic peptit. Nói chung, các polynucleotit có thể được lắp ráp từ được các mảnh được phân lập hoặc nhân dòng của cADN, ADN hệ gen, các oligonucleotit, hoặc các nucleotit riêng lẻ, hoặc tổ hợp của thành phần nêu trên. Mặc dù các trình tự polynucleotit được mô tả ở đây được thể hiện như là các trình tự ADN, các trình tự này bao gồm các trình tự ARN tương ứng của chúng, và các trình tự ARN hoặc ADN bổ sung (ví dụ, bổ sung hoàn toàn) của chúng, bao gồm các phần tử bổ sung ngược của chúng.

Polynucleotit khi được mô tả ở đây nói chung là sẽ chứa các liên kết phosphodieste, mặc dù trong một số trường hợp, các chất tương tự polynucleotit được bao gồm mà có thể có alternate liên kết xương sống, bao gồm, ví dụ, các liên kết phosphoramidat, phosphorothioat, phosphorodithioat, hoặc O-metylphophoroamidit; và liên kết xương sống và các liên kết peptit polynucleotit. Các polynucleotit tương tự khác bao gồm các polynucleotit tương tự có liên kết xương sống dương; liên kết xương sống không ion, và liên kết xương sống không ribose. Các thay đổi về liên kết xương sống có thể được thực hiện vì nhiều lý do khác nhau, ví dụ, để tăng độ ổn định và thời gian bán rã của phân tử này trong môi trường sinh lý hoặc như các mẫu dò trên chip sinh học. Các hỗn hợp của các polynucleotit xuất hiện tự nhiên và các phân tử tương tự có thể

được tạo ra; ngoài ra, các hỗn hợp của các phân tử tương tự polynucleotit khác, và các hỗn hợp của các polynucleotit xuất hiện tự nhiên và các phân tử tương tự có thể được tạo ra.

Các phân tử tương tự polynucleotit khác nhau được biết đến, bao gồm, ví dụ, các liên kết phosphoramidat, phosphorothioat, phosphorodithioat, O-metylphophoroamidit và các liên kết xương sống và các liên kết peptit polynucleotit. Các polynucleotit tương tự khác bao gồm các polynucleotit tương tự có liên kết xương sống dương; liên kết xương sống không ion, và liên kết xương sống không ribose. Các polynucleotit mà chứa một hoặc nhiều đường carboxyclic cũng được bao gồm.

Các phân tử tương tự khác bao gồm các peptit polynucleotit mà là các phân tử tương tự peptit polynucleotit. Các liên kết xương sống này về cơ bản là không ion dưới các điều kiện trung hòa, ngược với liên kết xương sống phosphodieste tích điện cao của các polynucleotit xuất hiện tự nhiên. Điều này có thể tạo ra các ưu điểm. Đầu tiên, liên kết xương sống peptit polynucleotit có thể thể hiện các động học lai hóa được cải thiện. Peptit polynucleotit có các thay đổi lớn hơn về nhiệt độ nóng chảy để ghép sai so với các cặp bazơ bắt cặp chính xác hoàn toàn. ADN và ARN điển hình là thể hiện sự giảm 2-4°C nhiệt độ nóng chảy để ghép sai bên trong. Với liên kết xương sống peptit polynucleotit không ion, sự giảm này gần hơn với khoảng 7-9°C. Tương tự là, do bản chất không ion của chúng, sự lai hóa của các bazơ được gắn vào các liên kết xương sống này tương đối là không nhạy với nồng độ muối. Ngoài ra, các peptit polynucleotit có thể không bị phân hủy hoặc bị phân hủy bởi các enzym tế bào ở mức độ ít hơn, và do đó có thể ổn định hơn.

Trong số các ứng dụng của các polynucleotit theo sáng chế, và các mảnh của chúng, có ứng dung của các mảnh làm mẫu dò trong các thử nghiệm lai axit nucleic hoặc các mồi để sử dụng trong các thử nghiệm khuếch đại axit nucleic. Các mảnh như vậy nói chung là bao gồm ít nhất là khoảng 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 hoặc nhiều hơn các nucleotit liền kề của một trình tự ADN. Theo các phương án khác, mảnh ADN bao gồm ít nhất là khoảng 10, 15, 20, 30, 40, 50 hoặc 60 hoặc nhiều hơn các nucleotit liền kề của một trình tự ADN. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện polynucleotit mã hóa protein có hoạt tính asparagin synthetaza hoặc mã hóa enzym asparagin synthetaza bao gồm việc sử dụng các mẫu dò hoặc mồi hoặc cả hai. Các mồi làm ví dụ được nêu trong các SEQ ID No: 13 đến 16. Theo đó,

theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến mồi oligonucleotit bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự nucleotit với ít nhất là 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100% độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 hoặc SEQ ID NO: 16. Phương pháp sử dụng các mồi này để phát hiện polynucleotit mã hóa protein có hoạt tính asparagin synthetaza và các ứng dụng của chúng cũng được đề cập.

Các tham số cơ bản ảnh hưởng đến việc lựa chọn các điều kiện lai hóa đối với các polynucleotit và sự hướng dẫn để đặt ra các điều kiện thích hợp được mô tả bởi Sambrook, J., E. F. Fritsch, và T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Sử dụng hiểu biết về mã di truyền kết hợp với các trình tự axit amin được mô tả ở đây, các tập hợp của các oligonucleotit thoái hóa có thể được chuẩn bị. Các oligonucleotit như vậy hữu ích để dùng làm mồi, ví dụ, trong phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), nhờ đó các mảnh ADN được phân lập và được khuếch đại. Theo các phương án nhất định, các mồi thoái hóa có thể được sử dụng làm các mẫu dò cho các thu viện di truyền. Các thư viện như vậy sẽ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các thư viện cADN, các thư viện hệ gen, và thậm chí là các thư viện ADN hoặc trình tự tag được thể hiện điện tử. Các trình tự tương đồng được xác định bởi phương pháp này, sau đó, được sử dụng làm mẫu dò để xác định các chất đồng đẳng của các trình tự được xác định ở đây.

Còn là ứng dụng tiềm năng là các polynucleotit và các oligonucleotit (ví dụ, mồi hoặc mẫu dò) mà lai hóa dưới các điều kiện có độ nghiệm ngặt thấp, thường là các điều kiện có độ nghiệm ngặt trung bình, và phổ biến là các điều kiện có độ nghiệm ngặt cao với (các) polynucleotit như được mô tả ở đây. Các tham số cơ bản mà ảnh hưởng đến sự lựa chọn các điều kiện lai hóa và sự hướng dẫn để đặt ra các điều kiện thích hợp có thể được xác định dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà dựa vào, ví dụ, độ dài hoặc thành phần bazơ của polynucleotit. Một cách để đạt được các điều kiện có độ nghiệm ngặt trung bình liên quan đến việc sử dụng dung dịch rửa sơ bộ chứa Natri Xitrat chuẩn 5x, Natri Dodexyl Sulphat 0,5%, axit Etylendiamintetraaxetic 1,0mM (pH 8.0), đệm lai hóa gồm khoảng 50% formamit, Natri Xitrat chuẩn 6x, và nhiệt độ lai hóa là khoảng 55°C (hoặc các dung dịch lai hóa tương

tự khác, như dung dịch lai hóa mà chứa khoảng 50% formamit, với nhiệt độ lai hóa là khoảng 42°C), và các điều kiện rửa là khoảng 60°C, trong Natri Xitrat chuẩn 0,5x, Natri Dodexyl Sulphat 0,1%. Nói chung, các điều kiện có độ nghiệm ngặt cao được định nghĩa là các điều kiện lai hóa như trên, nhưng với điều kiện rửa ở xấp xỉ là 68°C, Natri Xitrat chuẩn 0,2x, Natri Dodexyl Sulphat 0,1%. SSPE (SSPE 1 x là natri clorua 0,15M, natri phosphat 10mM, và axit etylendiamintetraaxetic 1,25mM, pH=7,4) có thể được thay thế cho Natri Xitrat chuẩn (Natri Xitrat chuẩn 1x là natri clorua 0,15M và natri xitrat 15mM) trong đệm lai và đệm rửa; các bước rửa được thực hiện trong 15 phút sau khi lai hóa hoàn tất. Nên được hiểu rằng nhiệt độ rửa và nồng độ muối rửa có thể được điều chỉnh khi cần thiết để đạt được mức độ nghiêm ngặt mong muốn bằng việc áp dụng các nguyên tắc cơ bản mà chi phối các phản ứng lai hóa và độ ổn định mạch kép, như đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả chi tiết hơn dưới đây (xem, ví dụ, Sambrook, J., E. F. Fritsch, và T. Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y). Khi lai hóa một polynucleotit với một polynucleotit đích có trình tự chưa xác định, độ dài lai hóa được giả sử là độ lài của polynucleotit lai hóa. Khi các polynucleotit của trình tự đã biết được lai hóa, độ dài lai hóa có thể được xác định bằng cách sắp hàng các trình tự của các polynucleotit và xác định vùng hoặc các vùng có độ bổ sung trình tự tối ưu. Nhiệt độ lai hóa cho các vật lai hóa tham gia có độ dài nhỏ hơn 50 cặp bazơ nên là 5 đến 10°C, ít hơn nhiệt độ nóng chảy của vật lai hóa, mà nhiệt độ nóng chảy được xác định theo các phương trình dưới đây. Đối với các vật lai có độ dài nhỏ hơn 18 cặp bazơ, nhiệt độ nóng chảy (°C)=2(số lượng bazơ A+T)+4(số lượng bazơ G+C). Đối với các vật lai có độ dài trên 18 cặp bazơ, nhiệt độ nóng chảy (°C)=81,5+16,6(log10 [Na+])+0,41(% G+C)-(600/N), trong đó N số lượng bazơ trong vật lai, và [Na+] là nồng độ của ion natri trong đệm lai ([Na+] với Natri Xitrat chuẩn 1x =0,165M). Điển hình lài, mỗi polynucleotit lai hóa như vậy có độ dài mà bằng ít nhất là 25% (phổ biến là ít nhất là 50%, 60%, hoặc 70%, và phổ biến nhất là ít nhất là 80%) độ dài của polynucleotit mà nó lai hóa, và có độ tương đồng trình tự với polynucleotit mà nó lai hóa ít nhất là 60% (ví dụ, ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100%).

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật, ADN thẳng có hai hướng có thể: hướng 5'-đến-3' và hướng 3'-đến-5'. Ví dụ, nếu trình tự tham chiếu được đặt theo hướng 5'-đến-3', và nếu trình tự thứ hai được đặt theo hướng 5'-đến-3' trong

cùng một phân tử/mạch polynucleotit, thì trình tự tham chiếu và trình tự thứ hai này được định hướng theo cùng một chiều hoặc có hướng giống nhau. Điển hình là, trình tự promotơ và gen quan tâm dưới sự điều hòa của promotơ cụ thể này được đặt theo cùng một hướng. Tuy nhiên, xét về trình tự tham chiếu được đặt theo hướng 5'-đến-3', nếu trình tự thứ hai được đặt theo hướng 3'-đến-5' trong cùng một phân tử/mạch polynucleotit, thì trình tự tham chiếu và trình tự thứ hai này được định hướng theo hướng đối nghĩa, hoặc có hướng đối nghĩa. Hai trình tự có hướng đối nghĩa so với nhau có thể được mô tả theo cách khác là có cùng một hướng, nếu trình tự tham chiếu (hướng 5'-đến-3') và trình tự bổ sung ngược của trình tự tham chiếu (trình tự tham chiếu được đặt theo chiều 5'-đến-3') được đặt trong cùng một phân tử/mạch polynucleotit. Các trình tự nêu trên được thể hiện theo hướng 5'-đến-3'.

Các cấu trúc tái tổ hợp được tạo ra ở đây có thể được sử dụng để biến nạp thực vật hoặc các tế bào thực vật để điều biến mức độ biểu hiện protein và/hoặc mức độ hoạt động. Cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp có thể bao gồm polynucleotit mã hóa một hoặc nhiều polynucleotit như được mô tả ở đây, được liên kết điều khiển được với vùng điều hòa thích hợp để biểu hiện polypeptit. Do đó, polynucleotit có thể bao gồm trình tự mã hóa mà mã hóa polypeptit như được mô tả ở đây. Các thực vật hoặc các tế bào thực vật mà mức độ biểu hiện và/hoặc mức độ hoạt động của protein được điều biến có thể bao gồm các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến, xuất hiện một cách không tự nhiên, chuyển gen, được con người tạo ra hoặc được thiết kết về di truyền. Thích hợp là, thực vật hoặc tế bào thực vật bao gồm hệ gen mà đã được thay đổi bằng sự cài ổn định ADN tái tổ hợp. ADN tái tổ hợp bao gồm ADN mà đã được thiết kế di truyền và được tạo cấu trúc phía bên ngoài tế bào và bao gồm ADN chứa ADN xuất hiện ự nhiên hoặc cADN hoặc ADN tổng hợp. Thực vật có thể bao gồm thực vật được tái tạo từ tế bào thực vật được biến nạp từ ban đầu và các thực vật con cháu từ các thế hệ sau hoặc các sản phẩm lai của thực vật được biến nạp. Thích hợp là, sự cải biến này thay đổi sự biểu hiện hoặc hoạt tính của polynucleotit hoặc polypeptit được mô tả ở đây so với thực vật đối chứng.

Polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit tái tổ hợp có thể là polypeptit nguyên gốc, hoặc có thể là dị hợp với tế bào. Trong một số trường hợp, cấu trúc tái tổ hợp bao gồm polynucleotit mà điều biến sự biểu hiện, được liên kết có thể điều khiển với vùng điều hòa. Các ví dụ về các vùng điều hòa thích hợp được mô tả ở đây.

Các vectơ chứa các cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp như các vectơ được mô tả ở đây cũng được đề cập. Các liên kết xương sống làm vectơ thích hợp bao gồm, ví dụ, cái được sử dụng thường xuyên trong lĩnh vực kỹ thuật như các plasmit, virut, nhiễm sắc thể nhân tạo, nhiễm sắc thể nhân tạo từ vi khuẩn, nhiễm sắc thể nhân tạo từ nấm men, hoặc nhiễm sắc thể nhân tạo từ thể thực khuẩn. Các vectơ biểu hiện thích hợp bao gồm, mà không chỉ giới hạn ở, các plasmit và các vectơ virut được bắt nguồn từ, ví dụ, thể thực khuẩn, baculovirut, và retrovirut. Nhiều vectơ và hệ thống biểu hiện có sẵn trên thị trường. Các vectơ có thể bao gồm, ví dụ, tâm tái bản, các vùng gắn khung hoặc marker. Gen marker có thể tạo ra kiểu hình có thể chọn lọc được ở tế bào thực vật. Ví dụ, marker có thể tạo ra mang tính kháng chất diệt sinh vật, như tính kháng kháng sinh (ví dụ, kanamyxin, G418, bleomyxin, hoặc hygromyxin), hoặc thuốc diệt cỏ (ví dụ, glyphosat, closulfuron hoặc phosphinothrixin). Ngoài ra, vectơ biểu hiện có thể bao gồm trình tự tag được thiết kế để tạo điều kiện thuận lợi cho việc thao tác hoặc phát hiện (ví dụ, tinh sạch hoặc định vị) polypeptit được biểu hiện. Trình tự tag, như các trình tự luciferase, beta-glucuronidase, protein huỳnh quang xanh lục, glutathion S-transferase, polyhistidin, c-myc hoặc hemagglutinin thường là được biểu hiện như một phần dung hợp với polypeptit được mã hóa. Các tag này có thể được chèn vào bất kỳ vị trí nào bên trong polypeptit, bao gồm ở đầu carboxyl hoặc đầu amino.

Thực vật hoặc tế bào thực vật có thể được biến nạp bằng việc có polynucleotit tái tổ hợp được cài vào hệ gen của nó để trở thành được biến nạp ổn định. Thực vật hoặc tế bào thực vật được mô tả ở đây có thể được biến nạp ổn định. Các tế bào được biến nạp ổn định thường là duy trì được polynucleotit được đưa vào với mỗi lần phân chia tế bào. Thực vật hoặc tế bào thực vật có thể được biến nạp tạm thời sao cho polynucleotit tái tổ hợp không được cài vào hệ gen của nó. Các tế bào được biến nạp tạm thời thường là mất tất cả hoặc một số phần của polynucleotit tái tổ hợp với mỗi lần phân chia tế bào sao cho polynucleotit tái tổ hợp được đưa vào này không thể bị phát hiện trong các tế bào con sau một số lần phân chia tế bào đủ lớn. Việc sử dụng biên tập hệ gen cũng được bao gồm.

Một số phương pháp hiện có trong lĩnh vực kỹ thuật để biến nạp tế bào thực vật mà tất cả được bao gồm ở đây, bao gồm các hạt biolistic, các kỹ thuật súng bắn gen, biến nạp dùng Agrobacterium, biến nạp dùng vectơ virut và điện biến nạp. Hệ thống Agrobacterium để cài ADN ngoại lai vào trong các nhiễm sắc thể của thực vật đã được

nghiên cứu, thay đổi, và khai thác một cách rộng rãi đối với kỹ thuật di truyền dùng cho thực vật. Các phân tử ADN tái tổ hợp trần bao gồm các trình tự ADN tương ứng với protein được tinh sạch quan tâm được liên kết điều khiển được, theo hướng có nghĩa hoặc hướng đối nghĩa, với các trình tự điều hòa, được nối với các trình tự T-ADN thích hợp bằng các phương pháp thông thường. Các phân tử ADN tái tổ hợp trần này được đưa vào các tế bào trần bằng các kỹ thuật polyetylen glycol hoặc bằng các kỹ thuật điện bến nạp, cả hai đều là các kỹ thuật tiêu chuẩn. Ngoài ra, các vectơ này bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa protein được tinh sạch quan tâm được đưa vào các tế bào Agrobacterium sống, mà sau đó chuyển ADN vào trong các tế bào thực vật. Biến nạp bằng ADN trần mà không có các trình tự vectơ T-ADN kèm theo có thể được thực hiện qua sự dung hợp các tế bào trần với các liposom chứa ADN hoặc qua điện biến nạp. ADN trần không được kèm theo bởi các trình tự vectơ T-ADN còn có thể được sử dụng để biến nạp tế bào qua các vật phóng siêu nhỏ tốc độ cao, trơ.

Nếu một tế bào hoặc mô được nuôi cấy được sử dụng làm mô nhận cho quá trình biến nạp, các cây có thể được tái tạo từ dịch nuôi cấy được biến nạp nếu mong muốn, bằng các kỹ thuật đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Sự lựa chọn các vùng điều hòa để được bao gồm trong cấu trúc tái tổ hợp phụ thuộc vào một số yếu tố, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hiệu suất, khả năng chọn lọc, khả năm cảm ứng, mức độ biểu hiện mong muốn, và sự biểu hiện ưu tiên mô hoặc biểu hiện ưu tiên tế bào. Đây là vấn đề thông thường đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật để điều biến sự biểu hiện của trình tự mã hóa bằng cách chọn lọc và đặt một cách thích hợp các vùng điều hòa so với trình tự mã hóa. Sự phiên mã polynucleotit có thể được điều biến theo cách tương tự. Một số vùng điều hòa thích hợp bắt đầu quá trình phiên mã chỉ trong, chủ yêu là trong, các loại tế bào nhất định. Các phương pháp để xác định và đặc trưng hóa các vùng điều hòa trong hệ gen ADN của thực vật được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các ví dụ về các promotơ bao gồm các promotơ đặc hiệu mô được nhận biết bởi các yếu tố đặc hiệu mô có trong các mô hoặc loại tế bào khác nhau (ví dụ, promotơ đặc hiệu rễ, promotơ đặc hiệu ngọn, promotơ đặc hiệu mạch gỗ), hoặc có mặt trong các giai đoạn phát triển khác nhau, hoặc khi đáp ứng lại các điều kiện môi trường. Các ví dụ về các promotơ bao gồm các promotơ cơ định mà có thể được hoạt hóa trong phần lớn các tế bào mà không yêu cầu chất cảm ứng đặc hiệu. Các ví dụ về các promotơ để điều khiển

sự tạo ra polypeptit ARNi bao gồm promotơ virut khảm súp lơ 35S (CaMV/35S), SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos hoặc ubiquitin-promotơ hoặc phaseolin-promotơ. Những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có khả năng tạo ra nhiều sự thay đổi của các promotơ tái tổ hợp.

Các promotơ đặc hiệu mô là các yếu tố kiểm soát phiên mã mà chỉ hoạt động trong các tế bào hoặc mô cụ thể ở các thời điểm cụ thể trong quá trình phát triển của thực vật, như trong các mô sinh dưỡng hoặc các mô sinh sản. Sự biểu hiện đặc hiệu mô có thể là ưu điểm, ví dụ, khi sự biểu hiện của các polynucleotit trong các mô nhất định được ưu tiên. Các ví dụ về các promotơ đặc hiệu mô dưới sự kiểm soát phát triển bao gồm các promotơ mà có thể bắt đầu phiên mã chỉ trong (hoặc chủ yếu là chỉ trong) các mô nhất định, như các mô sinh dưỡng, ví dụ, rễ hoặc lá, hoặc các mô sinh sản, như quả, noãn, hạt, hạt phấn, nhụy hoa, hoa, hoặc bất kỳ mô phôi nào. Các promotơ đặc hiệu mô sinh sản có thể là, ví dụ, đặc hiệu bao phấn, đặc hiệu noãn, đặc hiệu phôi, đặc hiệu nội nhũ, đặc hiệu vỏ noãn, đặc hiệu hạt và vỏ hạt, đặc hiệu hạt phấn, đặc hiệu cánh hoa, đặc hiệu lá đài, hoặc các tổ hợp của chúng.

Các ví dụ về các promotơ đặc hiệu lá bao gồm promotơ pyruvat, orthophosphat dikinaza (PPDK) từ thực vật C4 (ngô), promotơ cab-m1Ca+2 từ ngô, promotơ gen có liên quan đến Arabidopsis thaliana myb (Atmyb5), các promotơ ribulose biphosphat carboxylaza (RBCS) (ví dụ, các gen RBCS 1, RBCS2 và RBCS3A của cà chua được biểu hiện trong lá và cây con sinh trưởng dưới ánh sáng, RBCS1 và RBCS2 được biểu hiện trong sự phát triển các quả cà chua hoặc promotơ ribulose bisphosphat carboxylaza được biểu hiện chủ yếu là chỉ trong các tế bào thịt lá trong các phiến lá và bẹ lá ở mức độ cao).

Các ví dụ về các promotơ đặc hiệu quá trình già hóa bao gồm promotơ từ cà chua có hoạt tính trong quá trình chín nẫu của quả, già hóa và sự rụng lá, promotơ từ ngô của gen mã hóa xystein proteaza, promotơ của 82E4 và promotơ của các gen SAG.

Theo các phương án nhất định, promotơ đặc hiệu quá trình già hóa được ưu tiên. Thích hợp là, promotơ có thể là promotơ E4. Promotơ E4 đã được thông báo là một promotơ đặc hiệu quá trình giá hóa thích hợp cho thuốc lá mà sử dụng GUS làm gen báo cáo trong *Plant Mol Biol.* (2008) Mar;66(4):415-27. Một promotơ ví dụ khác là promotơ SAG12 như được mô tả trong *Plant Cell.* (1999) Jun;11(6):1073-80.

Các promotơ đặc hiệu bao phấn là các ví dụ khác. Các promotơ ưu tiên rễ đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được chọn. Các promotơ ưu tiên hạt bao gồm cả các promotơ đặc hiệu hạt (promotơ này hoạt động trong quá trình phát triển hạt như các promotơ của các protein được chứa trong hạt) và các promotơ trong quá trình nảy mầm hạt (các promotơ này hoạt động trong quá trình nảy mầm hạt). Các promotơ ưu tiên hạt như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, Cim1 (thông tin được cảm ứng bởi xytokinin); cZ19B1 (zein 19kDa ở ngô); milps (myo-inositol-1-phosphat synthaza); mZE40-2, còn được gọi là Zm-40; nuclc; và celA (xenluloza synthaza). Gama-zein là promotơ đặc hiệu nội nhũ. Glob-1 promotơ đặc hiệu phôi. Với thực vật hai lá mầm, các promotơ đặc hiệu hạt, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, beta-phaseolin từ cây đậu, napin, β-conglyxinin, lectin từ đậu nành, cruxiferin, và tương tự. Với thực vật một lá mầm, các promotơ đặc hiệu hạt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, promotơ zein 15kDa ở ngô, promotơ zein 22kDa ở ngô, promotơ zein 27kDa ở ngô, promotơ g-zein, promotơ gamma-zein 27kDa (như promotơ gzw64A, xem mã truy nhập Genbank số S78780), promotơ waxy, promotơ shrunken 1, promotơ shrunken 2, promotơ globulin 1 (xem mã truy nhập Genbank số L22344), promotơ Itp2 promotơ, promotơ cim1, các promotơ end1 và end2 từ ngô, promotơ nuc1, promotơ Zm40, eep1 và eep2; promotơ lec1, promotơ thioredoxin H; promotơ mlip15, promotơ PCNA2; và promotơ shrunken-2.

Các ví dụ về các promotơ có khả năm cảm ứng bao gồm các promotơ đáp ứng lại sự tấn công của tác nhân gây bệnh, các điều kiện kỵ khí, nhiệt độ tăng, ánh sáng, khô hạn, nhiệt độ lạnh, hoặc nồng độ muối cao. Các promotơ có thể cảm ứng bởi tác nhân gây bệnh bao gồm các promotơ có thể cảm ứng bởi tác nhân gây bệnh từ các protein có liên quan đến tác nhân gây bệnh (các protein PR), mà được cảm ứng sau sự xâm nhiễm của tác nhân gây bệnh (ví dụ, các protein PR, các protein SAR, beta-1,3-glucanaza, chitinaza).

Ngoài các promotơ thực vật, các promotơ thích hợp khác có thể được chuyển hóa từ gốc vi khuẩn, ví dụ, promotơ octopin synthaza, promotơ nopalin synthaza và các promotơ khác được chuyển hóa từ các plasmit Ti), hoặc có thể là được chuyển hóa từ các promotơ từ virut (ví dụ, các promotơ ARN 35S và ARN 19S của virut khảm súp lơ (CaMV), các promotơ cơ định của virut khảm thuốc lá, các promotơ 19S và 35S của virut khảm súp lơ (CaMV), hoặc promotơ 35S từ virut khảm cây huyền sâm). Theo các

phương án nhất định, promotơ từ virut khảm cây hoa phấn (MMV) được ưu tiên. Theo các phương án nhất định, promotơ 35S được ưu tiên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polypeptit được phân lập gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự polypeptit có độ tương đồng trình tự với bất kỳ trong số các trình tự polypeptit được mô tả ở đây ít nhất là 60%, bao gồm bất kỳ trong số các polypeptit được thể hiện trong danh mục trình tự. Thích hợp là, polypeptit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với nó ít nhất là 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%.

Theo một phương án, polypeptit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 ít nhất là 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%. Theo một phương án khác, polypeptit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 ít nhất là 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%.

Theo một phương án, polypeptit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 ít nhất là 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%, với điều kiện là polypeptit đã nêu chứa đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24.

Theo một phương án khác, polypeptit được phân lập bao gồm, gồm có hoặc gồm có về cơ bản là trình tự có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24.Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất biến thể polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi biến thể polynucleotit với độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất biến thể polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự axit amin được mã hóa bởi biến thể polynucleotit có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, với điều kiện là polypeptit đã nêu chứa đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24.Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các mảnh polypeptit có trình tự SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 hoặc các mảnh có trình tự SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các mảnh polypeptit có trình tự SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 hoặc các mảnh SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 mà có độ tương đồng trình tự với các mảnh tương ứng có trình tự SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 ít nhất là khoảng 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100%, với điều kiện là polypeptit đã nêu chứa đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24.Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:4 ít nhất là 78%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:6 và/hoặc SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%, được điều biến. Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 và/hoặc SEQ ID NO:4 và SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%, được điều biến.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, được điều biến, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị

trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, được điều biến, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:24.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:22 ít nhất là 78%, được điều biến, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:22.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit mà gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, được điều biến, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:24.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, được điều biến, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:24.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:22 và/hoặc SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, được điều biến với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 và SEQ ID NO:22 và/hoặc SEQ ID NO:24.

Theo các phương án nhất định, hoạt tính của polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tựvới SEQ ID NO:20 và/hoặc SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:24 ít nhất là 78%, được điều biến, với điều kiện là polypeptit đã nêu bao gồm đột biến codon kết thúc ở vị trí

tương đương với vị trí đã nêu trong SEQ ID NO:20 và/hoặc SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:24.Polypeptit này có thể bao gồm các mảnh của các trình tự bao gồm mức độ giống nhau hoặc tương đồng đủ hoặc đáng kể có chức năng làm asparagin synthetaza. Các mảnh của (các) polypeptit điển hình là giữ được một số hoặc toàn bộ hoạt tính của trình tự có chiều dài đủ – như ít nhất là khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% hoặc 100% hoạt tính.

Như được đề cập ở đây, polypeptit còn bao gồm các đột biến được tạo ra bằng cách đưa vào bất kỳ loại thay đổi nào (ví dụ, thêm, xóa, hoặc thay thế các axit amin; các thay đổi về trạng thái glycosyl hóa; các thay đổi mà ảnh hưởng đến việc tái cuộn gập hoặc đồng phân hóa, cấu trúc không gian ba chiều, hoặc các trạng thái tự liên kết), có điều kiện là chúng vẫn có một số hoặc toàn bộ chức năng hoặc hoạt tính của chúng làm asparagin synthetaza. Thích hợp là, chức năng hoặc hoạt tính làm asparagin synthetaza được điều biến, giảm hoặc ức chế. Thích hợp là, chức năng hoặc hoạt tính làm asparagin synthetaza bị ức chế sao cho hoạt tính asparagin synthetaza không thể phát hiện được.

Các polypeptit bao gồm các giống đột biến được tạo ra bằng cách đưa vào bất kỳ loại thay đổi nào (ví dụ, thêm, xóa, hoặc thay thế các axit amin; các thay đổi về trạng thái glycosyl hóa; các thay đổi mà ảnh hưởng đến việc tái cuộn gập hoặc đồng phân hóa, cấu trúc không gian ba chiều, hoặc các trạng thái tự liên kết), mà có thể được thiết kế một cách cố ý hoặc được phân lập cách tự nhiên. Biến thể có thể có các thay đổi mà tạo ra một thay đổi im lặng và tạo ra protein tương đương về chức năng. Các thay thế axit amin cố ý có thể được tạo ra trên cơ sở của độ tương đồng về độ phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ức nước và bản chất lưỡng tính của các góc này miễn là hoạt tính gắn kết thứ cấp của chất này được giữ lại. Ví dụ, các axit amin tích điện âm bao gồm axit aspartic và axit glutamic; các axit amin tích điện dương bao gồm lysin và arginin; và các axit amin cón các nhóm đầu phân cực không tích điện có các trị số về tính ưa nước tương tự nhau bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, glyxin, alanin, asparagin, glutamin, serin, threonin, phenylalanin, và tyrosin. Các phép thế bảo toàn có thể được thực hiện, ví dụ theo bảng dưới đây. Các axit amin trong cùng một ô trong cột thứ hai và tốt hơn là trong cùng một hàng trong cột thứ ba có thể được thế cho nhau:

HỢP CHẤT KHÔNG VÒNG	Không phân cực	Gly Ala Pro Ile Leu Val
	Phân cực - không tích điện	Cys Ser Thr Met Asn Gly
	Phân cực - tích điện	Asp Glu Lys Arg
VÒNG THƠM		His Phe TrpTyr

Polypeptit có thể là protein trưởng thành hoặc protein không trưởng thành hoặc protein được chuyển hóa từ protein không trưởng thành. Các polypeptit có thể là ở dạng thẳng hoặc được vòng hóa mà sử dụng các phương pháp đã biết. Các polypeptit điển hình là bao gồm ít nhất là 10, ít nhất là 20, ít nhất là 30, hoặc ít nhất là 40, hoặc ít nhất là 50, hoặc ít nhất là 100, hoặc ít nhất là 200, hoặc ít nhất là 300, hoặc ít nhất là 400, hoặc ít nhất là 500, hoặc ít nhất là 600 axit amin liền kề.

Polypeptit được mã hóa bởi SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 mà có 100% độ tương đồng trình tự với nó hoặc polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự đã nêu trong SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 hoặc SEQ ID NO:10 hoặc SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO: 20 hoặc SEQ ID NO:22 hoặc SEQ ID NO:24 cũng được bộc lộ.

Polypeptit có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ được biến nạp hoặc tái tổ hợp trong các điều kiện nuôi cấy thích hợp để biểu hiện polypeptit. Sau đó, polypeptit được biểu hiện thu được có thể được tinh sạch từ môi trường nuôi cấy này mà sử dụng các quá trình tinh sạch đã biết. Sự tinh sạch của polypeptit có thể bao gồm cột ái lực chứa các chất mà sẽ liên kết với polypeptit này; một hoặc nhiều bước của cột qua nhựa ái lực này; một hoặc nhiều bước bao gồm sắc ký tương tác kỵ nước; hoặc sắc ký ái lực miễn dịch. Ngoài ra, polypeptit còn có thể được biểu hiện ở dạng mà sẽ tạo

điều kiện thuận lợi cho việc tinh sạch. Ví dụ, nó có thể được biểu hiện như một polypeptit dung hợp, như các polypeptit dung hợp của polypeptit liên kết maltoza, glutathion-5-transferaza, his-tag hoặc thioredoxin. Các bộ kit để biểu hiện và tinh sạch polypeptit dung hợp có sẵn trên thị trường. Polypeptit có thể được gắn tag là một epitop và sau đó, được tinh sạch bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu mà hướng đến epitop này. Một hoặc nhiều bước sắc ký lỏng – như sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo có thể được thực hiện để tinh sạch thêm polypeptit này. Một số hoặc tất cả các bước tinh sạch nêu trên, trong các tổ hợp khác nhau, có thể được sử dụng để tạo ta polypeptit tái tổ hợp đồng hợp. Do đó, polypeptit được tinh sạch có thể là về cơ bản là không chứa các polypeptit khác và được định nghĩa ở đây là một "polypeptit về cơ bản là tinh sạch"; các polypeptit tinh sạch như vậy bao gồm các polypeptit, các mảnh, các thể đột biến, và tương tự. Sự biểu hiện, phân lập, và tinh sạch polypeptit và các mảnh có thể được thực hiện bằng bất kỳ kỹ thuật thích hợp nào, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp được mô tả ở đây.

Cũng có thể sử dụng cột ái lực như kháng thể đơn dòng được tạo ra kháng polypeptit, với polypeptit được biểu hiện tinh sạch bằng ái lực. Các polypeptit này có thể được lấy ra khỏi cột ái lực mà sử dụng các kỹ thuật thông thường, ví dụ, trong đệm rửa giải có nồng độ muối cao và sau đó, được thẩm tách trong đệm có nồng độ muối thấp hơn hoặc bằng cách thay đổi pH hoặc các thành phần khác phụ thuộc vào chất nền ái lực được sử dụng, hoặc có thể được lấy ra bằng cách cạnh tranh sử dụng cơ chất có trong tự nhiên của gốc ái lực.

Các chế phẩm protein hoặc các polynucleotit được phân lập hoặc về cơ bản là tinh sạch được bộc lộ. Polynucleotit hoặc protein "được phân lập" hoặc "được tinh sạch", hoặc phần có hoạt tính sinh học của chúng, về cơ bản là hoặc gần như là không chứa các thành phần mà thường là đi kèm hoặc tương tác với polynucleotit hoặc protein khi được tìm thấy trong môi trường xuất hiện tự nhiên của nó. Do đó, polynucleotit hoặc protein được phân lập hoặc được tinh sạch về cơ bản là không chứa vật liệu tế bào khác hoặc môi trường nuôi cấy khi được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp, hoặc về cơ bản là không chứa các tiền chất hóa học hoặc các chất hóa học khác khi được tổng hợp hóa học. Tối ưu là, polynucleotit "được phân lập" không chứa các trình tự (tối ưu là các trình tự mã hóa protein) mà nằm bên cạnh các trình tự polynucleotit này một cách tự nhiên (ví dụ, các trình tự nằm ở đầu 5' và 3' của polynucleotit) trong ADN hệ gen của sinh vật

mà từ đó polynucleotit được chuyển hóa. Ví dụ, theo các phương án khác nhau, polynucleotit được phân lập có thể bao gồm ít hơn khoảng 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1kb, 0,5kb, hoặc 0,1kb trình tự nucleotit mà nằm bên cạnh một cách tự nhiên polynucleotit này trong ADN hệ gen của tế bào mà từ đó polynucleotit được bắt nguồnchuyển hóa. Protein mà về cơ bản là không chứa vật liệu tế bào bao gồm các chế phẩm protein mà có ít hơn khoảng 30%, 20%, 10%, 5%, hoặc 1% (tính theo trọng lượng khô) của protein tạp chất.

Polypeptit còn có thể được tạo ra bằng sự tổng hợp hóa học thông thường đã biết. Các phương pháp để xây dựng polypeptit hoặc các mảnh của chúng bằng các phương pháp tổng hợp đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các trình tự polypeptit được xây dựng bằng cách tổng hợp, nhờ việc có chung cấu trúc bậc một, bậc hai hoặc bậc ba hoặc các đặc tính về cấu hình với các polypeptit nguyên gốc có thể có các đặc tính sinh học chung với nhau, bao gồm hoạt tính sinh học.

Những sự khác nhau về nền tảng di truyền có thể được phát hiện bằng sự khác nhau về kiểu hình hoặc bằng các kỹ thuật sinh học phân tử đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật - như giải trình tự axit nucleic, có mặt hoặc vắng mặt các marker di truyền (ví dụ, các marker ARN tiểu vệ tinh).

Các kháng thể mà có phản ứng miễn dịch với polypeptit được mô tả ở đây cũng được đề xuất. Các polypeptit, các mảnh, các biến thể, polypeptit dung hợp, và tương tự, như đã nêu trên, có thể được sử dụng như là "các chất gây miễn dịch" trong quá trình tạo ra các kháng thể có phản ứng miễn dịch với nó. Các kháng thể này có thể liên kết đặc hiệu với polypeptit qua các vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể. Các kháng thể liên kết đặc hiệu là các kháng thể mà sẽ nhận biết và liên kết đặc hiệu với polypeptit, các đồng đẳng, và các biến thể, nhưng không với các phân tử khác. Theo một phương án, các kháng thể này đặc hiệu với polypeptit có trình tự axit amin như nêu trên và không phản ứng chéo với polypeptit khác.

Cụ thể hơn là, polypeptit, mảnh, các biến thể, các polypeptit dung hợp, và tương tự chứa các quết định kháng nguyên hoặc epitop mà mang lại sự hình thành các kháng thể. Các quyết định kháng nguyên hoặc epitop này có thể là dạng thẳng hoặc dạng cấu trúc (không liên tục). Các epitop dạng thẳng bao gồm một phần đơn của các axit amin của polypeptit, trong khi các epitop dạng cấu trúc hoặc không liên tục bao gồm các phần của các axit amin từ các vùng khác nhau của chuỗi polypeptit mà được đưa lại gần nhau

sau khi cuộn gập polypeptit. Các epitop có thể được xác định bằng bất kỳ trong số các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, các epitop từ polypeptit này có thể được sử dụng làm các chất thử nghiên cứu, trong các thử nghiệm, và để tinh sạch các kháng thể liên kết đặc hiệu từ các chất như các huyết thanh đa dòng hoặc dịch nổi từ các tế bào lai được nuôi cấy. Các epitop này hoặc các biến thể của chúng có thể được tạo ra mà sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như tổng hợp pha rắn, phân cắt polypeptit bằng hóa chất hoặc enzym, hoặc sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Các kháng thể đa dòng và các kháng thể đơn dòng kháng polypeptit này đều có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật thông thường. Các dòng tế bào lai mà tạo ra các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với polypeptit cũng được bao gồm ở đây. Các tế bào lai này có thể được tạo ra và xác định bằng các kỹ thuật thông thường. Để sản xuất kháng thể, nhiều động vật chủ khác nhau có thể được tạo miễn dịch bằng cách cho tiêm polypeptit, mảnh, biến thể, hoặc thể đột biến của chúng. Các động vật chủ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thỏ, chuột, chuột nhắt, v.v. Nhiều chất phụ trợ khác có thể được sử dụng để tăng đáp ứng miễn dịch. Phụ thuộc vào vật chủ thuộc loài nào, các chất phụ trợ như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất trợ Freund (hoàn toàn và không hoàn toàn), gel khoáng như nhôm hydroxit, các chất hoạt động bề mặt như lysolexithin, các pluronic polyol, polyanion, peptit, các nhũ tương dầu, keyhole limpet hemoxyanin, dinitrophenol, và các chất trợ hữu ích cho người có tiềm năng như BCG (bacille Calmette-Guerin) và *Corynebacterium parvum*. Các kháng thể đơn dòng có thể thu được bằng các kỹ thuật thông thường. Các kháng thể đơn dòng như vậy có thể thuộc bất kỳ nhóm globulin miễn dịch nào bao gồm IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, và bất kỳ phân nhóm nào của chúng.

Các kháng thể này còn có thể được sử dụng trong các thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của các polypeptit hoặc các mảnh, *in vitro* hoặc *in vivo*. Các kháng thể này còn có thể được sử dụng trong tinh sạch polypeptit hoặc các mảnh bằng sắc ký ái lực miễn dịch.

Các mảnh của các polynucleotit và polypeptit được mã hóa bởi chúng cũng được đề cập. Các mảnh polynucleotit có thể mã hóa các mảnh protein mà duy trì được hoạt tính sinh học của protein nguyên bản. Ngoài ra, các mảnh polynucleotit mà hữu ích làm các mẫu dò lai hoặc mồi cho PCR thường là không mã hóa các mảnh protein mà duy trì

được hoạt tính sinh học. Ngoài ra, các mảnh của các trình tự nucleotit được bộc lô bao gồm các mảnh mà được lắp ráp bên trong các cấu trúc tái tổ hợp như được đề cập ở đây. Các mảnh của trình tự polynucleotit có thể nằm trong khảng từ ít nhất là khoảng 25 nucleotit, khoảng 50 nucleotit, khoảng 75 nucleotit, khoảng 100 nucleotit khoảng 150 nucleotit, khoảng 200 nucleotit, khoảng 250 nucleotit, khoảng 300 nucleotit, khoảng 400 nucleotit, khoảng 500 nucleotit, khoảng 600 nucleotit, khoảng 700 nucleotit, khoảng 800 nucleotit, khoảng 900 nucleotit, khoảng 1000 nucleotit, khoảng 1100 nucleotit, khoảng 1200 nucleotit, khoảng 1300 nucleotit, hoặc khoảng 1500 nucleotit, khoảng 2000 nucleotit, khoảng 3000 nucleotit, khoảng 4000 nucleotit, khoảng 5000 nucleotit, khoảng 6000 nucleotit, khoảng 7000 nucleotit, khoảng 8000 nucleotit, khoảng 9000 nucleotit, khoảng 10000 nucleotit, khoảng 15000 nucleotit, khoảng 20000 nucleotit, và lên đến polynucleotit có chiều dài đủ mã hóa polypeptit được mô tả ở đây. Các mảnh của trình tự polypeptit có thể năm trong khoảng từ ít nhất là khoảng 25 các axit amin, khoảng 50 các axit amin, khoảng 75 các axit amin, khoảng 100 các axit amin khoảng 150 các axit amin, khoảng 200 các axit amin, khoảng 250 các axit amin, khoảng 300 các axit amin, khoảng 400 các axit amin, khoảng 500 các axit amin, khoảng 600 các axit amin, hoặc lên đến polynucleotit có chiều dài đủ mã hóa polypeptit được mô tả ở đây.

Được hiểu rằng việc giảm biểu hiện hoặc hoạt tính của (các) asparagin synthetaza được mô tả ở đây có thể đạt được nhờ nhiều cách thức khác nhau. Theo các phương án nhất định, việc giảm biểu hiện của (các) asparagin synthetaza có thể được thực hiện ở mức độ hệ gen và/hoặc mức độ sản phẩm phiên mã mà sử dụng nhiều phân tử khác nhau mà cản trở sự phiên mã và/hoặc dịch mã bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các phân tử đối nghĩa, các phân tử siARN, các phân tử Ribozym, hoặc các phân tử ADNzym. Chèn một hoặc nhiều đột biến bào ít nhất một gen, bao gồm các đột biến xóa, chèn, đột biến đặc hiệu vị trí, các nucleaza ngón tay kẽm và tương tự cũng có thể được sử dụng. Theo các phương án khác, sự biểu hiện có thể bị ức chế ở mức độ protein sử dụng các chất đối kháng, hoặc các enzym mà phân cắt polypeptit và tương tự.

Theo một khía cạnh, thực vật đột biến hoặc bộ phận của nó bao gồm ít nhất là một đột biến và (i) polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%; (ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i); (iii) polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản

là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%; hoặc (iv) cấu trúc, vectơ hoặc vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit được phân lập đã nêu trong (i), trong đó ít nhất là một đột biến này giảm sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza so với thực vật đối chứng mà không chứa ít nhất là một đột biến được mô tả này. Theo một khía cạnh khác, thực vật đột biến hoặc bộ phận của nó bao gồm ít nhất là một đột biến và (i) polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:1 ít nhất là 90% hoặc có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7 ít nhất là 72%; (ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i); (iii) polypeptit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8 ít nhất là 78%; hoặc (iv) cấu trúc, vectơ hoặc vectơ biểu hiện bao gồm polynucleotit được phân lập đã nêu trong (i), trong đó ít nhất là một đột biến này giảm sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza so với thực vật đối chứng mà không chứa ít nhất là một đột biến được mô tả này.

Vì thế, thực vật hoặc tế bào thực vật có thể chứa một hoặc nhiều đột biến trong số *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1) và/hoặc *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3) và/hoặc *NtASN3-S* (SEQ ID NO: 9) và/hoặc *NtASN3-T* (SEQ ID NO: 11) và/hoặc *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) và/hoặc *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7), trong đó đột biến đã nêu dẫn đến sự biểu hiện giảm hoặc chức năng giảm của gen đã nêu hoặc protein được mã hóa bởi chúng. Thực vật hoặc tế bào thực vật có thể chứa một hoặc nhiều đột biến trong số *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1) hoặc *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3) hoặc *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) hoặc *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7), trong đó đột biến đã nêu dẫn đến sự biểu hiện giảm hoặc chức năng giảm của gen đã nêu hoặc protein được mã hóa bởi chúng. Thực vật hoặc tế bào thực vật có thể chứa một hoặc nhiều đột biến (ví dụ, các đột biến không mang nghĩa hoặc tương tự như được mô tả ở đây) trong *NtASN1-S* (SEQ ID NO: 1) và *NtASN1-T* (SEQ ID NO: 3) và *NtASN5-S* (SEQ ID NO: 5) và *NtASN5-T* (SEQ ID NO: 7) như được mô tả, trong đó đột biến đã nêu dẫn đến sự biểu hiện giảm hoặc chức năng giảm của gen đã nêu hoặc protein được mã hóa bởi chúng. Sự biểu hiện hoặc chức năng của (các) thể đột biến có thể được điều biến, bị ức chế hoặc bị giảm. Ngoại trừ một hoặc nhiều đột biến được mô tả ở đây, thực vật hoặc tế bào thực vật đột biến có thể có một hoặc nhiều

gen hoặc polypeptit khác. Theo các phương án nhất định, các thể đột biến này có thể có một hoặc nhiều đột biến khác trong một hoặc nhiều gen hoặc polypeptit khác. Các thể đột biến của *NtASN1-S, NtASN1-T*, *NtASN5-S* và *ASN5-T* mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều đột biến ở trong miền glutaminaza.

Ba đột biến kết thúc được xác định trong các bản sao của *ASN1-S* (ASN1-S_W156* - các SEQ ID No 19 và 20), *ASN1-T* (ASN1-T_W156* - các SEQ ID No 21 và 22) và *ASN5-S* (ASN5-S_Q66* - các SEQ ID No 23 và 24), nhưng không trong bản sao của *ASN5-T*. Do không có đột biến kết thúc được xác định trong *ASN5-T*, đột biến không phải đột biến kết thúc được xác định như một ứng viên tiềm năng. Có một xu hướng rõ ràng đối với sự giảm asparagin trong ASN1-S_W156*, ASN1-T_W156* và ASN5-S_Q66* so với các vật phân lập WT tương ứng của chúng, nhưng ngoại trừ ASN5-T_G59D.Sự giảm mạnh nhất được quan sát thấy đối với ASN1-T_W156* (83%), sau đó là đối với ASN5-S_Q66*(44%) và sau cùng là đối với ASN1-S_W156* (17%).Dòng ASN5-T_G59D đã thể hiện sự tăng asparagin nhẹ. Các đột biến kết thúc trong *ASN1-S* và *ASN5-S* không có ảnh hưởng đến sinh khối và kích cỡ của thực vật.Theo Canales *et al.*, 2012, các đột biến trong tất cả các gen *Nt-ASN* được bố trí trong miễn glutaminaza mà giải phóng amoniac từ glutamin, miền synthetaza sẽ được bố trí trong *Nt-ASN* từ axit amin R211 đến vùng liên ứng D451.

Thực vật hoặc tế bào thực vật đột biến đã nêu có thể là thể dị hợp hoặc thể đồng hợp với (các) đột biến này. Thực vật hoặc tế bào thực vật đột biến đã nêu có thể là dị hợp đối với ít nhất là một đột biến và đồng hợp đối với ít nhất là một đột biến khác. Thích hợp là, thực vật hoặc tế bào thực vật đột biến là đồng hợp đối với (các) đột biến.

Thể đột biến có thể có đột biến (ví dụ, đột biến không mang nghĩa mà tạo ra codon kết thúc) ở vị trí tương đương với vị trí axit amin 156 trình tự SEQ ID NO: 2. Một ví dụ về thể đột biến này là ASN1-S_W156* như được mô tả ở đây.

Thể đột biến có thể có đột biến (ví dụ, đột biến không mang nghĩa mà tạo ra codon kết thúc) ở vị trí tương đương với vị trí axit amin 156 trình tự SEQ ID NO: 4. Một ví dụ về thể đột biến này là ASN1-T_W156* như được mô tả ở đây.

Thể đột biến có thể có đột biến (ví dụ, đột biến không mang nghĩa mà tạo ra codon kết thúc) ở vị trí tương đương với vị trí axit amin 66 trình tự SEQ ID NO: 6. Một ví dụ về thể đột biến này là ASN5-S_Q66* như được mô tả ở đây.

Các tổ hợp của các đột biến này cũng được bao gồm. Các tổ hợp đã nêu có thể bao gồm tổ hợp của ASN1-S_W156* và ASN1-T_W156*; hoặc tổ hợp của ASN1-S_W156* và ASN5-S_Q66*; hoặc tổ hợp của ASN1-T_W156* và ASN5-S_Q66*; hoặc tổ hợp của ASN1-S_W156*, ASN1-T_W156* và ASN5-S_Q66*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp giảm nồng độ asparagin trong thực vật hoặc trong nguyên liệu thực vật có nguồn gốc từ thực vật này, phương pháp đã nêu bao gồm đưa vào hệ gen của thực vật đã nêu một hoặc nhiều đột biến mà giảm sự biểu hiện của ít nhất là một gen asparagin synthetaza, trong đó ít nhất là một gen asparagin synthetaza đã nêu mã hóa *NtASN1-S, NtASN1-T*, *NtASN5-S* hoặc *Nt ASN5-T*. Thích hợp là, ngoài (các) đột biến trong *NtASN1-S, NtASN1-T*, *NtASN5-S* hoặc *NtASN5-T*, một hoặc nhiều đột biến cũng có thể được đưa vào ít nhất là một alen của ít nhất là một, hai hoặc ba hoặc nhiều gen asparagin synthetaza nữa. Các đột biến trong *NtASN1-S và NtASN1-T* hoặc *NtASN5-S* và *NtASN5-T*cũng được bao gồm.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp xác định thực vật với nồng độ asparagin giảm, phương pháp đã nêu bao gồm sàng lọc mẫu axit nucleic từ thực vật quan tâm xét theo sự có mặt của một hoặc nhiều đột biến trong *NtASN1-S, NtASN1-T*, *NtASN5-S* hoặc *ASN5-T*. Thích hợp là, phương pháp đã nêu còn bao gồm sàng lọc mẫu axit nucleic đã nêu, hoặc mẫu axit nucleic khác từ thực vật quan tâm đã nêu, xét theo sự có mặt của đột biến trong *NtASN1-S*, sự có mặt của đột biến trong *NtASN1-T*, hoặc sự có mặt của đột biến trong *NtASN5-S*, hoặc sự có mặt của đột biến trong *NtASN5-T*.

Sáng chế còn đề cập đến thực vật hoặc tế bào thực vật mà là dị hợp hoặc đồng hợp đối với một hoặc nhiều đột biến trong gen mã hóa *NtASN1-S, NtASN1-T*, *NtASN5-S* hoặc *NtASN5-T*, trong đó (các) đột biến đã nêu dẫn đến sự biểu hiện của gen này bị giảm hoặc chức năng của protein được mã hóa bởi chúng bị giảm.

Theo một số phương án, (các) đột biến có lợi được đưa vào trong thực vật hoặc tế bào thực vật mà sử dụng phương án tạo đột biến, và đột biến được đưa vào được xác định hoặc được chọn lọc, sử dụng các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật - như phân tích lai Southern blot, giải trình tự ADN, phân tích PCR, hoặc phân tích kiểu hình. Các đột biến mà tác động đến sự biểu hiện gen hoặc cản trở chức năng của protein được mã hóa có thể được xác định, sử dụng các phương pháp mà đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Các đột biến chèn vào các exon từ gen thường

là tạo ra các thể đột biến rỗng. Các đột biến trong các gốc được bảo toàn có thể có hiệu quả đặc biệt trong ức chế hoặc giảm chức năng chuyển hóa của protein được mã hóa.

Các phương pháp để thu các polynucleotit và polypeptit đột biến cũng được đề cập. Bất kỳ thực vật quan tâm nào, bao gồm tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật có thể được biến đổi di truyền bằng các phương pháp khác nhau đã được biết đến để cảm ứng sự phát sinh đột biến, bao gồm tạo đột biến được định hướng vị trí, tạo đột biến được định hướng oligonucleotit, tạo đột biến nhờ hóa học, tạo đột biến nhờ bức xạ, tạo đột biến sử dụng các bazơ được cải biến, tạo đột biến sử dụng ADN mạch đôi có khoảng trống, tạo đột biến bẻ gãy mạch đôi, tạo đột biến sử dụng các chủng vật chủ không có khả năng sửa chữa, tạo đột biến bằng cách tổng hợp toàn bộ gen, chuyển ADN và các phương pháp tương đương khác.

Các biến thể polypeptit đột biến có thể được sử dụng để tạo ra các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến (ví dụ, thực vật đột biến, không có trong tự nhiên, chuyển gen, được tạo ra bởi con người hoặc được thiết kế về di truyền) hoặc các tế bào thực vật bao gồm một hoặc nhiều biến thể polypeptit đột biến. Thích hợp là, các biến thể polypeptit đột biến giữ được hoạt tính của polypeptit không đột biến. Hoạt tính của biến thể polypeptit đột biến có thể là cao hơn, thấp hơn hoặc gần như là giống như polypeptit không đột biến.

Các đột biến trong các trình tự nucleotit và polypeptit được mô tả ở đây có thể bao gồm các đột biến do con người tạo ra hoặc đột biến tổng hợp hoặc đột biến được thiết kế về di truyền. Các đột biến trong các trình tự nucleotit và polypeptit được mô tả ở đây có thể là đột biến mf thu được hoặc có thể thu được qua quá trình mà bao gồm một bước xử lý *in vitro* hoặc *in vivo*. Các đột biến trong các trình tự nucleotit và polypeptit được mô tả ở đây có thể là đột biến mf thu được hoặc có thể thu được qua quá trình mà bao gồm sử can thiệp của con người. Bằng cách ví dụ, quá trình này có thể bao gồm tạo đột biến mà sử dụng các hóa chất được bổ sung ngoại gen - như các hợp chất hữu cơgây đột biến, gây dị dạng, hoặc gây ung thư, ví dụ etyl metansulfonat (EMS), mà tạo ra các đột biến ngẫu nhiên trong vật liệu di truyền. Theo cách của ví dụ khác, quá trình này có thể bao gồm một hoặc nhiều bước thiết kế di truyền – như một hoặc nhiều bước thiết kế di truyền mà được mô tả ở đây hoặc các tổ hợp của chúng. Theo cách của ví dụ khác, quá trình này có thể bao gồm một hoặc nhiều bước lai thực vật.

Hoạt tính của một hoặc nhiều polypeptit asparagin synthetaza trong thực vật được giảm xuống hoặc bị ức chế theo sáng chế nếu hoạt tính chuyển hóa là thấp hơn cách có ý nghĩa theo thống kê so với hoạt tính chuyển hóa của (các) polypeptit asparagin synthetaza cùng loại trong thực vật mà không được biến đổi để ức chế hoạt tính chuyển hóa của polypeptit asparagin synthetaza đó và đã được nuôi trồng và thu hoạch, sử dụng cùng một quy trình. Hoạt tính của polypeptit asparagin synthetaza trong thực vật được coi là bị loại trừ khi nó không thể được phát hiện bằng các phương pháp thử nghiệm được mô tả ở đây. Các phương pháp xác định hoạt tính của polypeptit asparagin synthetaza được mô tả ở đây.

Ngoài việc tạo đột biến, các chế phẩm mà có thể điều biến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polynucleotit hoặc polypeptit được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các polynucleotit đặc hiệu trình tự mà có thể cản trở sự phiên mã của một hoặc nhiều gen nội sinh; các polynucleotit đặc hiệu trình tự mà có thể cản trở sự dịch mã của các sản phẩm phiên mã ARN (ví dụ, các ARN mạch đôi, các siARN, các ribozym); polynucleotit đặc hiệu trình tự mà có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của một hoặc nhiều protein; các polynucleotit đặc hiệu trình tự mà có thể cản trở hoạt tính enzym của một hoặc nhiều protein hoặc hoạt tính liên kết của một hoặc nhiều protein xét theo các cơ chất hoặc protein điều hòa; các kháng thể mà thể hiện tính đặc hiệu đối với một hoặc nhiều protein; các hợp chất phân tử nhỏ mà có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của một hoặc nhiều protein hoặc hoạt tính enzym của một hoặc nhiều protein hoặc hoạt tính liên kết của một hoặc nhiều protein; các protein ngón tay kẽm mà liên kết một hoặc nhiều polynucleotit; và các meganucleaza mà có hoạt tính về phía một hoặc nhiều polynucleotit. Các công nghệ biên tập gen, công nghệ biên tập di truyền và công nghệ biên tập hệ gen được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật.

Một phương pháp biên tập gen liên quan đến việc sử dụng các nucleaza tác động giống nhân tố hoạt hóa phiên mã (TALENs) mà cảm ứng các đứt gãy mạch đôi mà các tế bào có thể đáp ứng với các cơ chế sửa chữa. Nối đầu không tương đồng nối lại ADN từ một trong hai phía của đứt gãy mạch đôi mà có rất ít hoặc không có trình tự chồng lấn để gắn. Cơ chế sửa chữa này gây các lỗi sai trong hệ gen qua sự chèn hoặc xóa, hoặc sắp xếp lại nhiễm sắc thể. Bất kỳ lỗi sai nào có thể tạo ra các sản phẩm gen được mã hóa ở vị trí không có chức năng đó. Một phương pháp khác của biên tập gen liên quan đến việc sử dụng hệ thống CRISPR/Cas của vi khuẩn. Vi khuẩn và vi khuẩn có thể hiện các

yêu tố thuộc nhiễm sắc thể được gọi là các trình tự sắp xếp kiểu lặp đi lặp lại xen khoảng trống (CRISPR) mà là bộ phận của hệ thống miễn dịch đáp ứng mà bảo về sự xâm nhiễm của ADN plasmit và ADN virut. Trong các hệ thống CRISPR typ II, các ARN CRISPR (crARN) tác động với crARN hoạt hóa trans (tracrARN) và các protein kèm theo CRISPR (Cas) để tạo ra các đứt gãy mạch đôi trong ADN đích. Sự phân cắt đích bởi Cas9 yêu cầu sự bắt cặp bazơ giữa crARN và tracrARN cũng như sự bắt cặp bazơ giữa crARN và ADN đích. Sự nhận biết đích được tạo điều kiện thuận lợi bằng sự có mặt của một motif ngắn được gọi là một motif liền kề tiền đệm (PAM) mà được tạo ra thích hợp với trình tự NGG. Hệ thống này có thể được sử dụng để biên tập hệ gen. Cas9 thường là được tạo chương trình bởi ARN mạch đôi bao gồm crARN và tracrARN. Tuy nhiên, các thành phần cốt lõi của các ARN này có thể được kết hợp trong một 'ARN hướng dẫn' duy nhất để nhắm đến Cas9. Việc sử dụng ARN hướng dẫn để nhắm đến ADN để phân cắt đặc hiệu vị trí có tiềm năng là đơn giản hơn đáng kể so với các công nghệ hiện nay- như TALENs. Sử dụng chiến lược CRISPR/Cas, việc nhắm chọn lại phức nucleaza chỉ yêu cầu sự đưa vào một trình tự ARN mới và không cần phải thiết kế lại tính đặc hiệu của các yếu tố phiên mã protein.

Công nghệ đối nghĩa là một phương pháp khác đã được biết rõ mà có thể được sử dụng để điều biến sự biểu hiện của polypeptit. Polynucleotit của gen này bị ức chế được tách dòng và được nối điều khiển được với vùng điều hòa và trình tự kết thúc phiên mã sao cho mạch đối nghĩa của ARN được phiên mã. Sau đó, cấu trúc tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào thực vật và mạch đối nghĩa của ARN được tạo ra. Polynucleotit này không cần phải là toàn bộ trình tự của gen này bị ức chế, nhưng điển hình là sẽ về cơ bản là bổ sung với ít nhất là một phần của mạch có nghĩa của gen cần được ức chế.

Polynucleotit có thể được phiên mã thành ribozym, hoặc ARN xúc tác, mà ảnh hưởng đến sự biểu hiện của mARN. Các ribozym có thể được thiết kế để bắt cặp đặc hiệu với gần như là bất kỳ ARN đích nào và phân cắt liên kết xương sống phosphodieste ở vị trí cụ thể, nhờ đó bất hoạt về chức năng ARN đích. Các polynucleotit không tương đồng có thể mã hóa các ribozym được thiết kế để cắt các sản phẩm phiên mã mARN, nhờ đó ngăn cản sự biểu hiện của polypeptit. Các ribozym hình đầu búa hữu ích để phá hủy các mARN cụ thể, mặc dù nhiều ribozym khác nhau mà cắt mARN ở các trình tự nhận biết đặc hiệu vị trí có thể được sử dụng. Các ribozym hình đầu búa cắt các mARN ở các vị trí được thể hiện bởi các vùng sườn mà tạo ra các cặp bazơ bổ sung với mARN

đích. Yêu cầu duy nhất là ARN đích chứa trình tự nucleotit 5'-UG-3'. Sự xây dựng và sản xuất các ribozym hình đầu búa được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật. Các trình tự ribozym hình đầu búa có thể được ẩn chứa trong ARN ổn định như ARN vận chuyển (tARN) để tăng hiệu quả phân cắt *in vivo*.

Theo một phương án, polynucleotit đặc hiệu trình tự mà có thể cản trở sự dịch mã của (các) sản phẩm phiên mã là ARN can thiệp. Sự cản trở ARN hoặc sự gây im lặng ARN là một quá trình được bảo toàn tiến hóa mà nhờ đó các mARN cụ thể có thể được nhắm đích để phân hủy bằng enzym. Một ARN mạch đôi (ARN mạch đôi) được đưa vào hoặc được tạo ra bởi tế bào (ví dụ, virut ARN mạch đôi, hoặc các polynucleotit ARN can thiệp) để bắt đầu quá trình ARN can thiệp. ARN mạch đôi có thể được chuyển đổi thành các nhiều sợi đôi ARN can thiệp nhỏ có độ dài năm trong khoảng 21-23bp bằng các ARNaza III, mà là các endonucleaza đặc hiệu ARN mạch đôi. Các ARN can thiệp có thể được nhận biết tiếp sau đó bằng các phức gây im lặng do ARN mà thúc đẩy sự tháo xoắn của ARN can thiệp nhỏ thông qua một quá trình phụ thuộc ATP. Mạch đối nghĩa được tháo xoắn của ARN can thiệp nhỏ hướng dẫn các phức gây im lặng do ARN được hoạt hóa đến mARN đích chứa trình tự bổ sung với mạch đối nghĩa của ARN can thiệp nhỏ này. mARN đích và mạch đối nghĩa có thể tạo ra chuỗi xoắn dạng A, và khe chính của chuỗi xoắn dạng A có thể được nhận biết bởi các phức gây im lặng do ARN được hoạt hóa. mARN đích có thể được pahan cắt bằng các phức gây im lặng do ARN được hoạt hóa ở một vị trí đơn được xác định bởi vị trí liên kết của đầu 5' của mạch ARN can thiệp nhỏ. Các phức gây im lặng do ARN được hoạt hóa có thể được tái sử dụng để xúc tác một sự kiện phân cắt khác. Một ví dụ về trình tự mã hóa từ *NtASN1-S* mà có thể được sử dụng để làm im lặng cả bản sao *NtASN1-S* và *NtASN1-T* được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 17. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit đã nêu trong SEQ ID NO: 17 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% với nó. Một ví dụ về trình tự mã hóa từ *NtASN5-T* mà có thể được sử dụng để làm im lặng cả bản sao *NtASN1-S* và *NtASN1-T* được thể hiện trong trình tự SEQ ID NO: 18. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến trình tự đã nêu trong SEQ ID NO: 17. Do đó, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến trình tự nucleotit đã nêu trong SEQ ID NO: 18 hoặc trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72%, 73%, 74%, 75%, 80%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95% 96%, 97%, 98%, 99% với nó. Phương pháp làm im lặng gen mà sử dụng các trình tự mã hóa này và các ứng dụng của chúng cũng được bao gồm.

Các vectơ biểu hiện ARN can thiệp có thể bao gồm các cấu trúc ARN can thiệp mã hóa các polynucleotit ARN can thiệp mà thể hiện hoạt tính cản trở ARN bằng cách giảm sự biểu hiện nồng độ mARN, tiền mARN, hoặc các biến thể ARN có liên quan. Các cấu trúc ví dụ được thể hiện trên Fig.22. Các vectơ biểu hiện có thể bao gồm promotơ được đặt phía trước và liên kết có thể điều khiển được với cấu trúc ARN can thiệp, như được mô tả tiếp ở đây. Các vectơ biểu hiện ARN can thiệp có thể bao gồm promotơ lõi nhỏ nhất thích hợp, cấu trúc ARN can thiệp quan tâm, vùng điều hòa phía trước (5'), vùng điều hòa phía sau (3'), bao gồm các tín hiệu kết thúc phiên mã và tín hiệu gắn polyadenin, và các trình tự khác đã được biết bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như là các marker chọn lọc khác nhau.

Các polynucleotit có thể được tạo ra ở nhiều dạng khác nhau, bao gồm như các cấu trúc mạch đôi (cụ thể là phân tử ARN mạch đôi bao gồm mạch đối nghĩa và mạch có nghĩa bổ sung), các cấu trúc giống kẹp tóc mạch đôi, hoặc các cấu trúc mạch đơn (cụ thể là phân tử ssARN chỉ bao gồm mạch đối nghĩa). Các cấu trúc này có thể bao gồm mạch kép, mạch kép không đối xứng, cấu trúc hình kẹp tóc hoặc cấu trúc bậc hai hình kẹp tóc không đối xứng, mà có các mạch có nghĩa và đối nghĩa tự bổ sung. ARN can thiệp mạch đôi có thể được chuyển hóa nhờ enzym thành các ARN can thiệp nhỏ, mạch đôi. Một trong số các mạch của mạch đôi ARN can thiệp nhỏ có thể được gắn với trình tự bổ sung bên trong mARN đích và các biến thể ARN có liên quan. Các phần sợi đôi ARN can thiệp nhỏ/mARN được nhận biết bởi các phức gây im lặng do ARN mà có thể cắt các ARN ở nhiều vị trí theo cách phụ thuộc trình tự, tạo ra sự phân hủy mARN đích và các biến thể ARN có liên quan.

Các phân tử ARN mạch đôi có thể bao gồm các phân tử ARN can thiệp nhỏ được tạo ra gồm một oligonucleotit đơn trong cấu trúc thân-vòng cuộn, trong đó các vùng có nghĩa và đối nghĩa tự bổ sung của phân tử ARN can thiệp nhỏ được liên kết bằng phương tiện là (các) đoạn nối dựa trên polynucleotit hoặc không dựa trên polynucleotit, cũng như ARN mạch đơn, vòng có hai hoặc nhiều cấu trúc vòng cuộn và hệ thống thân bao gồm các mạch có nghĩa và đối nghĩa tự bổ sung, trong đó ARN vòng có thể được xử lý *in vivo* hoặc *in vitro* để tạo ra phân tử ARN can thiệp nhỏ có hoạt tính có khả năng trung gian cho ARN can thiệp.

Việc sử dụng các phân tử ARN dạng kẹp tóc nhỏ cũng được bao gồm. Chúng bao gồm trình tự đối nghĩa đặc hiệu ngoài trình tự bổ sung ngược (có nghĩa), điển hình là được ngăn cách bằng trình tự đệm hoặc trình tự vòng cuộn. Sự phân cắt trình tự đệm hoặc vòng cuộn tạo ra phân tử ARN mạch đơn và trình tự bổ sung ngước của nó, sao cho chung có thể gắn để tạo ra phân tử ARN mạch đôi, tùy ý là có các bước xử lý bổ sung mà có thể tạo ra sự bổ sung hoặc loại bỏ một, hai, ba hoặc nhiều nucleotit từ đầu 3' hoặc đầu 5' của một hoặc cả hai mạch). Trình tự đệm có thể là có độ dài đủ để cho phép các trình tự có nghĩa và đối nghĩa gắn vào và tạo ra cấu trúc mạch đôi (hoặc thân) trước sự phân cắt của trình tự đệm (và, tùy ý là, các bước xử lý tiếp theo mà có thể dẫn đến sự thêm hoặc loại bỏ một, hai, ba, bốn, hoặc nhiều nucleotit hơn từ đầu 3' hoặc đầu 5' của một hoặc cả hai mạch). Trình tự đệm điển hình là một trình tự nucleotit không có liên quan mà được nằm giữa hai vùng trình tự nucleotit bổ sung, khi được gắn vào polynucleotit mạch đôi, bao gồm ARN dạng kẹp tóc nhỏ. Trình tự đệm nói chung là bao gồm nằm trong khoảng 3 đến khoảng 100 nucleotit.

Bất kỳ ARN polynucleotit quan tâm nào có thể được tạo ra bằng cách chọn lọc thành phần trình tự thích hợp, kích cỡ vòng cuộn, và độ dài thân để tạo ra phần sợi đôi dạng kẹp tóc. Khoảng thích hợp để thiết kế độ dài của phần thân của phần sợi kép dạng kẹp tóc, bao gồm các độ dài của phần thân gồm ít nhất là khoảng 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20 nucleotit – như khoảng 14-30 nucleotit, khoảng 30-50 nucleotit, khoảng 50-100 nucleotit, khoảng 100-150 nucleotit, khoảng 150-200 nucleotit, khoảng 200-300 nucleotit, khoảng 300-400 nucleotit, khoảng 400-500 nucleotit, khoảng 500-600 nucleotit, và khoảng 600-700 nucleotit. Khoảng thích hợp để thiết kế độ dài của vòng cuộn của sợi đôi dạng kẹp tóc, bao gồm các độ dài của phần vòng cuộn gồm khoảng 4-25 nucleotit, khoảng 25-50 nucleotit, hoặc dài hơn nếu độ dài của phần thân của sợi đôi dạng kẹp tóc là đáng kể. Theo các phương án nhất định, phân tử ARN mạch đôi hoặc phân tử ssARN có độ dài nằm trong khoảng 15 đến khoảng 40 nucleotit. Theo một phương án khác, phân tử ARN can thiệp nhỏ là phân tử ARN mạch đôi hoặc phân tử ssARN có độ dài nằm trong khoảng 15 đến khoảng 35 nucleotit. Theo một phương án khác, phân tử ARN can thiệp nhỏ là phân tử ARN mạch đôi hoặc phân tử ssARN có độ dài nằm trong khoảng 17 đến khoảng 30 nucleotit. Theo một phương án khác, phân tử ARN can thiệp nhỏ là phân tử ARN mạch đôi hoặc phân tử ssARN có độ dài nằm trong khoảng 19 đến khoảng 25 nucleotit. Theo một phương án khác, phân tử ARN can thiệp

nhỏ là phân tử ARN mạch đôi hoặc phân tử ssARN có độ dài nằm trong khoảng 21 đến khoảng 23 nucleotit. Theo các phương án nhất định, các cấu trúc dạng kẹp tóc với các vùng có phần mạch đôi dài hơn 21 nucleotit có thể thúc đẩy hiệu quả gây im lặng nhờ ARN can thiệp, bất kể độ dài và trình tự của vòng cuộn. Các trình tự mã hóa ví dụ được sử dụng cho sự cản trở ARN được nêu trong các SEQ ID No: 17 và 18.

Trình tự mARN đích điển hình là có độ dài nằm trong khoảng 14 đến khoảng 50 nucleotit. Do đó, trình tự mARN đích có thể, được quét trên các vùng có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 14 đến khoảng 50 nucleotit mà tốt hơn là đáp ứng một hoặc nhiều tiêu chí sau đối với trình tự đích: tỷ lệ A+T/G+C nằm trong khoảng 2:1 đến khoảng 1:2; dinucleotit AA hoặc dinucleotit CA ở đầu 5' của trình tự đích; trình tự gồm ít nhất là 10 nucleotit liên tiếp độc nhất với mARN đích (tức là, trình tự này không có mặt trong các trình tự mARN khác từ cùng loài thực vật); và không có "các loạt" gồm của nhiều hơn ba nucleotit guanin (G) liên tiếp hoặc hơn ba nucleotit xytosin (C) liên tiếp. Các tiêu chí này có thể được đánh giá mà sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã được biết đế trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, các chương trình máy tính như BLAST có thể được sử dụng để tìm kiếm các cơ sở dữ liệu công bố công khai để xác định liệu trình tự đích được chọn có là độc nhất với mARN đích hay không. Ngoài ra, trình tự đích có thể được chọn (và trình tự ARN can thiệp nhỏ được thiết kế) mà sử dụng phần mềm máy tính hiện có trên thị trường (ví dụ, OligoEngine, Target Finder and small interfering RNA Design Tool mà hiện có trên thị trường).

Theo một phương án, các trình tự mARN đích được chọn mà có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 14 đến khoảng 30 nucleotit mà đáp ứng một hoặc nhiều tiêu chí nêu trên. Theo một phương án, các trình tự đích được chọn mà có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 16 đến khoảng 30 nucleotit mà đáp ứng một hoặc nhiều tiêu chí nêu trên. Theo một phương án khác, các trình tự đích được chọn mà có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 19 đến khoảng 30 nucleotit mà đáp ứng một hoặc nhiều tiêu chí nêu trên. Theo một phương án, các trình tự đích được chọn mà có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 19 đến khoảng 25 nucleotit mà đáp ứng một hoặc nhiều tiêu chí nêu trên.

Theo một phương án ví dụ, các phân tử ARN can thiệp nhỏ chứa trình tự đối nghĩa đặc hiệu mà trình tự bổ sung với ít nhất là 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, hoặc nhiều nucleotit liền kề của bất kỳ trong số các trình tự polynucleotit được mô tả ở đây.

Trình tự đối nghĩa đặc hiệu bao gồm phân tử ARN can thiệp nhỏ có thể giống hoặc về cơ bản là giống với trình tự bổ sung của trình tự đích. Theo một phương án, trình tự đối nghĩa đặc hiệu bao gồm phân tử ARN can thiệp nhỏ có độ tương đồng ít nhất là khoảng 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% với trình tự bổ sung của trình tự mARN đích. Các phương pháp xác định độ tương đồng trình tự được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng chương trình BLASTN của phần mềm của Đại học Wisconsin Computer Group (GCG) hoặc được cung cấp trên trang web NCBI.

Trình tự đối nghĩa đặc hiệu của các phân tử ARN can thiệp nhỏ có thể thể hiện khả năng biến đổi bằng cách tạo ra khác biệt (ví dụ, bằng cách thế nucleotit, bao gồm đồng hoán hoặc đảo hoán) ở một, hai, ba, bốn hoặc nhiều nucleotit so với trình tự mARN đích. Khi các thay thế nucleotit này có mặt trong mạch đối nghĩa của phân tử ARN mạch đôi, nucleotit bổ sung trong mạch có nghĩa mà nhờ đó nucleotit thay thế sẽ điển hình là tạo ra liên kết hydro, sự ghép cặp bazơ có thể có hoặc không được thay thế một cách tương ứng. Các phân tử ARN mạch đôi, trong đó một hoặc nhiều sự thay thế nucleotit xuất hiện trong trình tự có nghĩa, mà không trong mạch đối nghĩa, cũng được bao gồm. Khi trình tự đối nghĩa cỉa phân tử ARN can thiệp nhỏ chứa một hoặc nhiều vị trí ghép sai giữa trình tự nucleotit của ARN can thiệp nhỏ và trình tự nucleotit đích, như nêu trên, các vị trí ghép sai có thể được tìm thấy ở đầu 3', đầu 5' hoặc trong phần trung tâm của mạch đối nghĩa.

Theo một phương án khác, các phân tử ARN can thiệp nhỏ chứa trình tự đối nghĩa đặc hiệu mà có khả năng lai chọn lọc trong điều kiện nghiêm ngặt với một phần của gen đích hoặc mARN đích có trong tự nhiên. Như đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật, các thay đổi về độ nghiêm ngặt của các điều kiện lai có thể đạt được bằng cách thay đổi thời gian, nhiệt độ hoặc nồng độ của các dung dịch được sử dụng cho các bước lai và rửa. Các điều kiện thích hợp có thể còn phụ thuộc một phần vào các trình tự nucleotit cụ thể được sử dụng, ví dụ, trình tự của mARN hoặc gen đích.

Một phương pháp để cảm ứng việc làm im lặng ARN mạch đôi trong thực vật là phương pháp biến nạp gen cấu trúc mà tạo ra ARN dạng kẹp tóc (xem Smith *et al.* (2000) *Nature*, 407, 319-320). Các cấu trúc này bao gồm các vùng đảo ngược của trình tự gen đích, được phân cách bởi trình tự đệm thích hợp. Việc chèn vùng intron của thực vật có

chức năng như một mảnh trình tự đệm làm tăng hiệu quả của việc cảm ứng làm im lặng gen, do tạo ra ARN dạng kẹp tóc được ghép nối intron (Wesley *et al.* (2001) *Plant J.*, 27, 581-590). Thích hợp là, độ dài của phần thân nằm trong khoảng từ khoảng 50 nucleotit đến khoảng 1 kilobazơ tính theo chiều dài. Các phương pháp để đưa vào ARN dạng kẹp tóc được ghép nối intron được mô tả rõ trong lĩnh vực kỹ thuật (xem ví dụ, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (2008) 72, 2, 615-617).

Các phân tử ARN cản trở có cấu trúc sợi đôi hoặc mạch đôi, ví dụ ARN mạch đôi hoặc ARN dạng kẹp tóc nhỏ, có thể có các đầu bằng, hoặc có thể có các phần nhô ra 3' hoặc 5'. Khi được sử dụng ở đây, "phần nhô ra" dùng để chỉ nucleotit hoặc các nucleotit không bắt cặp mà nhô ra khỏi cấu trúc sợi đôi khi đầu 3' của một mạch ARN kéo dài vượt quá đầu 5' của mạch còn lại (phần nhô ra 3'), hoặc ngược lại (phần nhô ra 5'). Các nucleotit này chứa phần nhô ra có thể là ribonucleotit, deoxyribonucleotit hoặc các bản được biến đổi của chúng. Theo một phương án, ít nhất là một mạch của phân tử ARN can thiệp có phần nhô ra 3' có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 6 nucleotit. Theo các phương án khác, phần nhô ra 3' có độ dài nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 5 nucleotit, từ khoảng 1 đến khoảng 3 nucleotit và từ khoảng 2 đến khoảng 4 nucleotit.

Khi phân tử ARN can thiệp bao gồm phần nhô ra 3' ở một đầu của phân tử này, đầu còn lại có thể là đầu bằng hoặc cũng có một phần nhô ra (5' hoặc 3'). Khi phân tử ARN can thiệp bao gồm phần nhô ra ở cả hai đầu của phân tử này, độ dài của các phần nhô ra có thể giống hoặc khác nhau. Theo một phương án, phân tử ARN can thiệp bao gồm các phần nhô ra 3' gồm khoảng 1 đến khoảng 3 nucleotit trên cả hai đầu của phân tử này. Theo phương án khác, phân tử ARN can thiệp là ARN mạch đôi có đầu nhô ra 3' gồm 2 nucleotit ở cả hai đầu của phân tử này. Theo một phương án khác, nucleotit tạo nên phần nhô ra của ARN quan tâm là dinucleotit TT hoặc dinucleotit UU.

Khi xác định phần trăm tương đồng của phân tử ARN can thiệp chứa một hoặc nhiều phần nhô ra với trình tự mARN đích, (các) phần nhô ra này có thể được hoặc không được đưa vào xem xét. Ví dụ, các nucleotit từ phần nhô ra 3' và lên tới 2 nucleotit từ đầu 3' hoặc đầu 5' của mạch đôi này có thể được biến đổi mà không mất đáng kể hoạt tính của phân tử ARN can thiệp nhỏ.

Các phân tử ARN can thiệp có thể bao gồm một hoặc nhiều cấu trúc mũ 5' hoặc cấu trúc mũ 3'. Phân tử ARN can thiệp có thể bao gồm cấu trúc mũ ở đầu 3' của mạch

có nghĩa, mạch đối nghĩa, hoặc cả mạch có nghĩa và đối nghĩa; hoặc ở đầu 5’ của mạch có nghĩa, mạch đối nghĩa, hoặc ả mạch có nghĩa và đối nghĩa của phân tử ARN can thiệp. Ngoài ra, phân tử ARN can thiệp có thể bao gồm cấu trúc mũ ở cả hai đầu 3' và đầu 5' của phân tử ARN can thiệp. Thuật ngữ "cấu trúc mũ" dùng để chỉ sự thay đổi hóa học được kết hợp ở một trong hai đầu của oligonucleotit, mà bảo vệ phân tử này khỏi sự phân hủy bởi exonucleaza, và còn có thể tạo điều kiện thuận lợi cho việc vận chuyển hoặc định vị bên trong tế bào.

Một sự thay đổi khác có thể áp dụng với các phân tử ARN can thiệp là liên kết hóa học với phân tử ARN can thiệp của một hoặc nhiều gốc hoặc thể liên hợp mà tăng cường hoạt tính, sự phân bố trong tế bào, sự hấp thu của tế bào, tính khả dụng sinh học hoặc độ ổn định của phân tử ARN can thiệp. Các polynucleotit có thể được tổng hợp hoặc được biến đổi bằng các phương pháp đã được thiết lập rõ ràng trong lĩnh vực kỹ thuật. Các biến đổi hóa học có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các biến đổi 2', sự đưa vào các bazơ không có trong tự nhiên, sự gắn cộng hóa trị với phối tử, và sự thế chỗ của các liên kết phosphat bằng các liên kết thiophosphat. Theo phương án này, tính nguyên vẹn của cấu trúc sợi đôi được tăng cường bằng ít nhất là một, và điển hình là hai, liên kết hóa học. Việc tạo liên kết hóa học có thể đạt được bằng bất kỳ kỹ thuật nào trong số nhiều kỹ thuật khác nhau đã được biết rõ, ví dụ bằng cách tạo ra các liên kết cộng hóa trị, liên kết ion hoặc liên kết hydro; các tương tác kỵ nước, các tương tác van der Waals hoặc các tương tác xếp chồng; bằng các phương tiện gồm sự phối hợp kim loại-ion, hoặc qua việc sử dụng các phân tử tương tự purin.

Nucleotit ở một hoặc cả hai mạch đơn có thể được thay đổi để điều biến sự hoạt hóa các enzym của tế bào, như, ví dụ, không giới hạn ở, các nucleaza nhất định. Các kỹ thuật để giảm hoặc ức chế sự hoạt hóa các enzym của tế bào được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thay đổi 2'-amino, các thay đổi 2'-flo, các thay đổi 2'-alkyl, các thay đổi liên kết xương sống không tích điện, các thay đổi morpholino, các thay đổi 2'-O-metyl, và phosphoramidat. Do đó, ít nhất là một nhóm 2'-hydroxyl của các nucleotit trên ARN mạch đôi được thay thế bằng một nhóm hóa học. Ngoài ra, ít nhất là một nucleotit có thể được thay đổi để tạo ra nucleotit bị khóa. Nucleotit bị khóa này chứa cầu metylen hoặc etylen mà nối 2'-oxy của ribose với 4'-cacbon của ribose. Sự đưa nucleotit bị khóa vào oligonucleotit cải thiện ái lực đối với các trình tự bổ sung và tăng nhiệt độ nóng chảy lên một vài độ.

Các phối tử có thể được liên hợp với phân tử ARN can thiệp, ví dụ, để tăng cường sự hấp thụ tế bào của nó. Theo các phương án nhất định, phối tử kỵ nước được liên hợp với phân tử này để tạo điều kiện thuận lợi cho sự thấm trực tiếp qua màng tế bào. Các phương án tiếp cận này đã được sử dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho sự thấm tế bào của các oligonucleotit đối nghĩa. Trong các trường hợp nhất định, sự liên hợp giữa phối tử cation với các oligonucleotit thường dẫn đến tính kháng với các nucleaza được cải thiện. Các ví dụ điển hình về các phối tử cation bao gồm propylamoni và dimetylpropylamoni. Các oligonucleotit đối nghĩa có thể giữ ái lực liên kết cao của chúng với mARN khi phối tử cation được phân tán thông qua oligonucleotit này.

Các phân tử và các polynucleotit được mô tả ở đây có thể được tạo ra, sử dụng các kỹ thuật tổng hợp pha rắn đã được biết rõ. Bất kỳ cách nào khác cho việc tổng hợp này đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, ngoài ra hoặc theo cách khác, có thể được sử dụng.

Các phương án khác nhau được hướng đến các vectơ biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit hoặc một hoặc nhiều cấu trúc ARN can thiệp được mô tả ở đây. Các cấu trúc ví dụ được thể hiện trên Fig.21.

Các phương án khác nhau được hướng đến các vectơ biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit hoặc một hoặc nhiều cấu trúc ARN can thiệp mã hóa một hoặc nhiều polynucleotit ARN can thiệp được mô tả ở đây mà có khả năng tự gắn để tạo ra cấu trúc kẹp tóc, trong đó cấu trúc này bao gồm (a) một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây; (b) trình tự thứ hai mã hóa thành phần đệm mà tạo ra vòng cuộn của cấu trúc kẹp tóc; và (c) trình tự thứ ba bao gồm trình tự bổ sung ngược của trình tự thứ nhất, được định vị theo hướng giống như hướng thứ nhất, trong đó trình tự thứ hai được đặt giữa trình tự thứ nhất và trình tự thứ ba, và trình tự thứ hai được liên kết có thể điều khiển được với trình tự thứ nhất và với trình tự thứ ba.

Các trình tự theo sáng chế có thể được sử dụng để xây dựng các polynucleotit khác mà không tạo ra các cấu trúc dạng kẹp tóc. Ví dụ, ARN mạch đôi có thể được tạo ra bằng cách (1) phiên mã mạch thứ nhất của ADN bằng cách tạo liên kết có thể điều khiển được với promotơ thứ nhất, và (2) phiễn mã trình tự bổ sung ngược của mạch thứ nhất của mảnh ADN mảnh bằng cách tạo liên kết có thể điều khiển được với promotơ thứ hai. Mỗi mạch của polynucleotit này có thể được phiên mã từ cùng một vectơ biểu hiện, hoặc từ các vectơ biểu hiện khác nhau. Phần sợi đôi ARN mà có hoạt tính sự cản

trở ARN có thể được chuyển hóa nhờ ezym thành các phân tử ARN can thiệp nhỏ để điều biến nồng độ ARN.

Do đó, các phương án khác nhau được hướng đến các vectơ biểu hiện bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit hoặc cấu trúc ARN can thiệp được mô tả ở đây mã hóa các polynucleotit ARN can thiệp có khả năng tự gắn, trong đó cấu trúc này bao gồm (a) một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây; và (b) trình tự thứ hai bao gồm trình tự bổ sung (ví dụ, bổ sung ngược) của trình tự thứ nhất, được đặt theo hướng giống như trình tự thứ nhất.

Các chế phẩm và phương pháp khác nhau được tạo ra để điều biến mức độ biểu hiện nội gen của một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây (hoặc bất kỳ tổ hợp nào của chúng như được mô tả ở đây) bằng cách thúc đẩy sự đồng ức chế biểu hiện gen. Hiện tượng đồng ức chế xảy ra là kết quả của việc đưa nhiều bản sao của một gen chuyển vào tế bào chủ từ thực vật. Việc cài nhiều bản bao của một gen chuyển có thể dẫn đến sự biểu hiện được điều biến của gen chuyển và gen nội sinh đích. Mức độ đồng ức chế phụ thuộc vào mức độ tương đồng trình tự giữa gen chuyển và gen nội sinh đích. Việc làm im lặng cả gen nội sinh và gen chuyển có thể xảy ra nhờ sự metyl hóa trên diện rộng các locut im lặng (tức là, promotơ nội sinh và gen quan tâm nội sinh) mà có thể ngăn cản phiên mã. Ngoài ra, trong một số trường hợp, đồng ức chế gen nội sinh và gen chuyển có thể xảy ra bởi sự làm im lặng gen sau khi phiên mã, trong đó các sản phẩm phiên mã có thể được tạo ra nhưng tốc độ phân hủy được tăng lên làm ngăn cản sự tích lũy các sản phẩm phiên mã. Cơ chế đồng ức chế bằng cách làm im lặng gen sau khi phiên mã được cho là giống với sự cản trở ARN, trong ARN đó, dường như là cả chất khởi đầu quan trọng và đích trong các quá trình này, và có thể được trung gian ít nhất là một phần bởi cùng một bộ máy phân tử, có thể là quá sự phân hủy các mARN được hướng dẫn bởi ARN.

Sự đồng ức chế các axit nucleic có thể đạt được bằng cách cài nhiều bản sao của axit nucleic hoặc các mảnh của chúng, làm các gen chuyển, vào trong hệ gen của thực vật quan tâm. Thực vật chủ có thể được biến nạp vectơ biểu hiện bao gồm promotơ được nối có thể điều khiển được với axit nucleic hoặc các mảnh của chúng. Nhiều phương án khác nhau được hướng đến các vectơ biểu hiện để thúc đẩy sự đồng ức chế của các gen nội sinh bao gồm promotơ liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit.

Nhiều phương án khác nhau được hướng đến các phương pháp để điều biến mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều trong số (các) polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc bất kỳ tổ hợp nào của chúng như được mô tả ở đây) bằng cách cài nhiều bản sao của (các) polynucleotit vào trong hệ gen của thực vật, bao gồm: biến nạp vào tế bào chủ thực vật vectơ biểu hiện mà bao gồm promotơ được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit.

Nhiều chế phẩm và phương pháp khác nhau được tạo ra để điều biến mức độ biểu hiện gen nội sinh bằng cách điều biến sự dịch mã của mARN. Tế bào chủ thực vật có thể được biến nạp vectơ biểu hiện bao gồm: promotơ được liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit, được đặt theo hướng đối nghĩa xét theo promotơ này để cho phép sự biểu hiện của các polynucleotit ARN có trình tự có trình tự bổ sung với một phần của mARN.

Các vectơ biểu hiện khác nhau để điều biến sự dịch mã của mARN có thể bao gồm: promotơ liên kết có thể điều khiển được với polynucleotit, trong đó trình tự này được bố trí theo hướng đối nghĩa xét theo promotơ. Độ dài của các polynucleotit đối nghĩa mã hóa ARN có thể thay đổi, và có thể là nằm trong khoảng từ khoảng 15-20 nucleotit, khoảng 20-30 nucleotit, khoảng 30-50 nucleotit, khoảng 50-75 nucleotit, khoảng 75-100 nucleotit, khoảng 100-150 nucleotit, khoảng 150-200 nucleotit, và khoảng 200-300 nucleotit.

Các gen còn có thể được nhắm đích cho quá trình gây bất hoạt bằng cách đưa các gen nhảy (transposon) (ví dụ, các yếu tố IS) vào hệ gen của các thực vật quan tâm. Các yếu tố di truyền di động này có thể được đưa vào bằng quá trình thụ tinh- lai hữu tính và các đột biến chèn có thể được sàng lọc đối với sự mất hoạt tính protein. Gen bị gián đoạn trong thực vật bố mẹ có thể được đưa vào trong các thực vật khác bằng cách lai thực vật bố mẹ với thực vật không được tạo đột biến bởi transposon, ví dụ, thụ tinh- lai hữu tính. Kỹ thuật chọn giống tiêu chuẩn bất kỳ đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng. Theo một phương án, một hoặc nhiều gen có thể bị bất hoạt bằng việc chèn một hoặc nhiều transposon. Các đột biến có thể dẫn đến sự gián đoạn đồng hợp một hoặc nhiều gen, sự gián đoạn dị hợp một hoặc nhiều gen, hoặc sự kết hợp giữa cả hai gồm gián đoạn đồng hợp và gián đoạn dị hợp nếu nhiều hơn một gen bị gián đoạn. Các yếu tố có thể di chuyển được thích hợp bao gồm các gen

nhảy ngược, các retroposon, và các yếu tố giống như SINE. Các phương pháp này được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Ngoài ra, các gen có thể được nhắm đích cho quá trình gây bất hoạt bằng cách đưa các ribozym chuyển hóa từ một số ARN dạng vòng nhỏ mà có khả năng tự phân cắt và tái bản trong thực vật. Các ARN này có thể sao chép một mình (các ARN viroid) hoặc với virut trợ giúp (các ARN vệ tinh). Các ví dụ về các ARN thích hợp bao gồm các ARN được chuyển hóa từ viroid gây vết bỏng nắng cho quả bơ và các ARN vệ tinh được chuyển hóa từ virut gây đốm hình nhẫn cho thuốc lá, virut lucerne transient streak virus, velvet thuốc lá mottle virus, solanum nodiflorum mottle virus, và subterranean clover mottle virus. Nhiều loại ribozym đặc hiệu ARN đích khác đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

Như được thảo luận ở đây, sự biểu hiện một hoặc nhiều polypeptit có thể được điều biến bằng các phương pháp không chuyển gen - như tạo ra một hoặc nhiều đột biến trong một hoặc nhiều gen, như được thảo luận ở đây. Các phương pháp mà đưa một đột biến ngẫu nhiên vào trình tự gen có thể bao gồm tạo đột biến hóa học, tạo đột biến EMS và tạo đột biến bức xạ. Các phương pháp mà đưa một hoặc nhiều đột biến được định hướng vào trong tế bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở kỹ thuật biên tập hệ gen, cụ thể là tạo đột biến do nucleaza ngón tay kẽm và định hướng nhờ các tổn thương cục bộ trong hệ gen (TILLING: targeting induced local lesions in genome), tái tổ hợp tương đồng, tạo đột biến định hướng oligonucleotit, và tạo đột biến nhờ meganucleaza. Theo một phương án, TILLING được sử dụng. Đây là một kỹ thuật tạo đột biến mà có thể được sử dụng để tạo ra và/hoặc xác định các polynucleotit mã hóa polypeptit có sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính được thay đổi. TILLING còn cho phép chọn lọc các thực vật mang các đột biến này. TILLING kết hợp sự tạo đột biến mật độ lớn với các phương pháp sáng học thông lượng cao. Các phương pháp để TILLING được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật (xem McCallum *et al.*, (2000) *Nat Biotechnol* 18: 455-457 và Stemple (2004) *Nat Rev Genet* 5(2): 145-50).

Một số các ví dụ không giới hạn về các đột biến là các đột biến xóa, chèn và các đột biến sai nghĩa có ít nhất là một nucleotit, các dạng đa hình của đơn nucleotit và trình tự lặp đơn giản. Sau khi tạo đột biến, sàng lọc có thể được thực hiện để xác định các đột biến mà tạo ra các codon kết thúc trước khi hoàn thành hoặc trong các trường hợp còn lại, các gen không có chức năng. Sau khi tạo đột biến, sàng lọc có thể được thực hiện để

xác định các đột biến mà tạo ra các gen có chức năng mà có khả năng được biểu hiện ở các mức độ gia tăng. Sàng lọc thể đột biến có thể được thực hiện bằng cách giải trình tự, hoặc nhờ việc sử dụng một hoặc nhiều đoạn dò hoặc đoạn mồi đặc hiệu với gen hoặc protein. Các đột biến đặc hiệu trong các polynucleotit còn có thể được tạo ra mà có thể dẫn đến sự biểu hiện gen được điều biến, độ bền của mARN được điều biến, hoặc độ bền của protein được điều biến. Các thực vật này được đề cập đến ở đây là các thực vật "không có trong tự nhiên" hoặc thực vật "đột biến". Điển hình là, các thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên sẽ bao gồm ít nhất là một phần là axit nucleic ngoại lai hoặc tổng hợp hoặc do con người tạo ra (ví dụ, ADN hoặc ARN) mà không có trong thực vật trước khi nó được xử lý. Axit nucleic ngoại lai có thể là một nucleotit đơn, hai hoặc nhiều nucleotit, hai hoặc nhiều nucleotit liền kề hoặc hai hoặc nhiều nucleotit không liền kề – như ít nhất là 10, 20, 30, 40, 50,100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 hoặc 1500 hoặc nhiều hơn nucleotit liền kề hoặc không liền kề.

Các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên có thể có tổ hợp bất kỳ của một hoặc nhiều đột biến trong một hoặc nhiều gen mà dẫn đến nồng độ protein được điều biến. Ví dụ, các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên có thể có một đột biến đơn trong một gen đơn; nhiều đột biến trong một gen; một đột biến trong hai hoặc nhiều hoặc ba hoặc nhiều hoặc bốn hoặc nhiều gen; hoặc nhiều đột biến trong hai hoặc nhiều hoặc ba hoặc nhiều hoặc bốn hoặc nhiều gen. Các ví dụ về các đột biến này được mô tả ở đây. Theo cách của ví dụ khác, các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên có thể có một hoặc nhiều đột biến trong phần cụ thể của (các) gen – như trong vùng của gen mà mã hóa vị trí hoạt động của protein hoặc một phần của chúng. Theo cách của ví dụ khác, các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên có thể có một hoặc nhiều đột biến trong vùng bên ngoài của (các) gen – như trong vùng ở phía trước hoặc phía sau gen mà nó điều hòa, với điều kiện là chúng điều biến hoạt động hoặc sự biểu hiện của (các) gen. Các thành phần nằm phía trước có thể bao gồm các promotơ, các chất tăng cường, hoặc các yếu tố phiên mã. Một số thành phần - như chất tăng cường- có thể được đặt phía trước hoặc phía sau gen mà nó điều hòa. (Các) thành phần không cần phải được bố trí gần với gen mà nó điều hòa, do một số thành phần đã được phát hiện là nằm cách xe vài trăm nghìn cặp bazơ về phía trước hoặc phía sau của gen mà nó

điều hòa. Các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên có thể có một hoặc nhiều đột biến nằm trong vòng 100 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 200 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 300 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 400 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 500 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 600 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 700 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 800 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 900 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 1000 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 1100 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 1200 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 1300 nucleotit đầu tiên của (các) gen, trong vòng 1400 nucleotit đầu tiên của (các) gen hoặc trong vòng 1500 nucleotit đầu tiên của (các) gen. Các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên có thể có một hoặc nhiều đột biến được bố trí bên trong tập hợp thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu, thues bảy, thứ tám, thứ chín, thứ mười, thứ mười một, thứ mười hai, thứ mười ba, thứ mười bốn, thứ mười lăm của 100 nucleotit của (các) gen hoặc tổ hợp của chúng. Các thực vật hoặc các tế bào thực vật đột biến hoặc không có trong tự nhiên (ví dụ, thực vật hoặc các tế bào thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến và tương tự, như được mô tả ở đây) bao gồm các biến thể polypeptit đột biến được bộc lộ.

Theo một phương án, các hạt từ thực vật được tạo đột biến và sau đó mọc lên thành các thực vật đột biến thế hệ thứ nhất. Sau đó, các thực vật thế hệ thứ nhất được tự thụ phấn và hạt từ thực vật thế hệ thứ nhất mọc lên thành các thực vật thế hệ thứ hai, mà sau đó, được sàng lọc các đột biến trong các locut của chúng. Mặc dù nguyên liệu thực vật đột biến có thể được sàng lọc đột biến, ưu điểm của quá trình sàng lọc các thực vật thế hệ thứ hai là tất cả các đột biến soma tương ứng với các đột biến dòng mầm. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rõ rằng nhiều nguyên liệu thực vật khác nhau, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt, hạt phấn, mô thực vật hoặc các tế bào thực vật, có thể được tạo đột biến để tạo ra các thực vật đột biến. Tuy nhiên, loại nguyên liệu thực vật được tạo đột biến có thể có ảnh hưởng khi axit nucleic thực vật này được sàng lọc các đột biến. Ví dụ, khi hạt phấn được là đối tượng của quá trình tạo đột biến trước quá trình thụ phấn của thực vật không được tạo đột biến, các hạt thu được từ quá trình thụ phấn này mọc lên thành các thực vật thế hệ thứ nhất. Mọi tế bào của các thực vật thế

hệ thứ nhất sẽ mang các đột biến được tạo ra trong hạt phấn; do đó, sau đó các thực vật thế hệ thứ nhất này có thể được sàng lọc các đột biến thay vì chờ đến thế hệ thứ hai.

Các tác nhân gây đột biến mà tạo ra chủ yếu là các đột biến điểm và đột biến xóa ngắn, đột biến chèn, đột biến đảo chuyển, và hoặc đột biến đồng chuyển, bao gồm các tác nhân gây đột biến hóa học hoặc bức xạ, có thể được sử dụng để tạo ra các đột biến. Các tác nhân gây đột biến bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, etyl metansulfonat, metylmetan sulfonat, N-etyl-N-nitrosure, trietylmelamin, N-metyl-N-nitrosoure, procarbazin, clorambuxil, xyclophosphamit, dietyl sulfat, acrylamit monome, melphalan, nitơ mù tạt, vincristin, dimetylnitrosamin, N-metyl-N'-nitro-Nitrosoguanidin, nitrosoguanidin, 2-aminopurin, 7,12 dimetyl-benz(a)anthraxen, etylen oxit, hexametylphosphoramit, bisulfan, các diepoxyalkan (diepoxyoctan, diepoxybutan, và tương tự), 2-metoxy-6-clo-9[3-(etyl-2-clo-etyl)aminopropylamino]acridin dihydroclorua và formaldehyt.

Các đột biến ngẫu phát trong locut mà có thể không trực tiếp được tạo ra bởi tác nhân gây đột biến cũng được bao gồm, với điều kiện là chúng tạo ra kiểu hình mong muốn. Các chất gây đột biến thích hợp có thể còn bao gồm, ví dụ, phóng xạ ion hóa – như tia X, tia gama, chiếu xạ nơtron nhanh và phóng xạ UV. Bất kỳ phương pháp chuẩn bị axit nucleic thực vật nào đã được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng để chuẩn bị axit nucleic thực vật để sàng lọc đột biến.

Axit nucleic được chuẩn bị từ các thực vật, các tế bào thực vật, hoặc nguyên liệu thực vật có thể tùy ý là được tạo vốn gen để đẩy nhanh quá trình sàng lọc đột biến trong quần thể thực vật có nguồn gốc từ mô thực, các tế bào hoặc nguyên liệu thực vật đột biến. Một hoặc nhiều thế hệ sau của các thực vật, các tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật có thể được sàng lọc. Kích cỡ của nhóm được tạo vốn gen tùy ý phụ thuộc vào độ nhạy của phương pháp sáng lọc sử dụng.

Sau khi các mẫu axit nucleic được tạo vốn gen tùy ý, chúng có thể là đối tượng cho các kỹ thuật khuếch đại đặc hiệu, như phản ứng chuỗi polymeraza. Một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc đoạn dò bất kỳ đặc hiệu với gen hoặc trình tự này ngay liền kề với gen này có thể được sử dụng để khuếch đại các trình tự bên trong mẫu axit nucleic được tạo vốn gen tùy ý. Các ví dụ về các đoạn mồi oligonucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16. Thích hợp là, các SEQ ID No: 13 và các SEQ ID No: 14 được sử dụng kết hợp để phát hiện *NtAsn-1*. Thích hợp là, các

SEQ ID No: 15 và các SEQ ID No: 16 được sử dụng kết hợp để phát hiện *NtAsn-5*. Thích hợp là, một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc đoạn dò được thiết kế để khuếch đại các vùng của locut mà ở đó, các đột biến hữu ích có khả năng phát sinh lớn nhất. Tốt nhất là, đoạn mồi được thiết kế để phát hiện đột biến bên trong các vùng của polynucleotit. Ngoài ra, tốt hơn nếu (các) đoạn mồi và (các) đoạn dò tránh khỏi các vị trí đa hình đã biết để dễ sàng lọc các đột biến điểm. Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc khuếch đại các sản phẩm, một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc đoạn dò có thể được đánh dấu mà sử dụng bất kỳ phương pháp đánh dấu thông thường nào. (Các) đoạn mồi và (các) đoạn dò có thể được thiết kế dựa vào các trình tự được mô tả ở đây mà sử dụng các kỹ thuật mà được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho việc khuếch đại các sản phẩm, (các) đoạn mồi hoặc (các) đoạn dò có thể được đánh dấu mà sử dụng bất kỳ phương pháp đánh dấu thông thường nào. Chúng có thể được thiết kế dựa vào các trình tự được mô tả ở đây mà sử dụng các kỹ thuật mà được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Các đa hình có thể được xác định bằng các phương thức đã biết trong lĩnh vực ktx thuật và một số đã được mô tả trong tài liệu kỹ thuật.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật đột biến. Phương pháp này bao gồm tạo ra ít nhất là một tế bào thực vật bao gồm gen mã hóa polynucleotit có chức năng được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây). Tiếp theo, ít nhất là một tế bào thực vật được xử lý trong các điều kiện có hiệu quả điều biến hoạt tính của (các) polynucleotit được mô tả ở đây. Sau đó, ít nhất là một tế bào thực vật đột biến được nhân giống thành thực vật đột biến, trong đó thực vật đột biến có nồng độ của (các) polypeptit được mô tả (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) so với nồng độ đó của thực vật đối chứng. Theo một phương án của phương pháp tạo ra thực vật đột biến này, bước xử lý bao gồm cho ít nhất là một tế bào làm đối tượng của chất gây đột biến hóa học như được mô tả ở trên và trong các điều kiện có hiệu quả để tạo ra ít nhất là một tế bào thực vật đột biến. Theo một phương án của phương pháp này, bước xử lý bao gồm cho ít nhất là một tế bào làm đối tượng của nguồn bức xạ trong các điều kiện có hiệu quả để tạo ra ít nhất là một tế bào thực vật đột biến. Thuật ngữ "thực vật đột biến" bao gồm các thực vật đột biến, trong đó kiểu gen được thay đổi so với thực vật đối chứng, thích hợp là, bằng phương thức khác với thiết kế di truyền hoặc biến đổi di truyền.

Theo các phương án nhất định, thực vật đột biến, tế bào thực vật đột biến hoặc nguyên liệu thực vật đột biến có thể chứa một hoặc nhiều đột biến mà có trong tự nhiên trong một thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật khác và mang lại tính trạng mong muốn. Đột biến này có thể được kết hợp (ví dụ, đưa gen vào loài khác) thành một thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật khác (ví dụ, thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật với nền tảng di truyền khác với thực vật mà từ đó đột biến được chuyển hóa) để tạo ra đột biến mà không có trong tự nhiên trong thực vật đó và tạo ra tính trạng theo đó. Do đó, bằng cách ví dụ, đột biến mà có trong tự nhiên trong thực vật thứ nhất có thể được đưa vào lthực vật thứ hai – như thực vật thứ hai có nền tảng di truyền khác với thực vật thứ nhất. Do đó, người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật có khả năng tìm kiếm và xác định thực vật mang một cách tự nhiên trong hệ gen của nó một hoặc nhiều alen đột biến của các gen được mô tả ở đây mà mang lại tính trạng mong muốn. (Các) alen đột biến mà có trong tự nhiên có thể được chuyển sang thực vật thứ hai bằng nhiều phương pháp khác nhau bao gồm chọn giống. lai ngược và chuyển gen vào cá thể khác để tạo ra dòng, giống hoặc cây lai mà có một hoặc nhiều đột biến trong các gen được mô tả ở đây. Các thực vật mà thể hiện tính trạng mong muốn có thể được sàng lọc khỏi vốn gen của các thực vật đột biến. Thích hợp là, sự chọn lọc được thực hiện mà sử dụng hiểu biết về các trình tự nucleotit như được mô tả ở đây. Hệ quả là, có thể sàng lọc tính trạng di truyền so với đối chứng. Phương án tiếp cận sàng lọc này có thể bao gồm sự ứng dụng các kỹ thuật khuếch đại và/hoặc lai axit nucleic thông thường như được thảo luận ở đây. Do đó, theo khía cạnh khác đề cập đến phương pháp xác định thực vật đột biến bao gồm các bước: (a) lấy mẫu bao gồm axit nucleic từ thực vật; và (b) xác định trình tự axit nucleic của polynucleotit, trong đó sự khác nhau về trình tự polynucleotit so với trình tự polynucleotit của thực vật đối chứng là dấu hiệu chỉ ra rằng thực vật đã nêu là thực vật đột biến. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định thực vật đột biến mà tích lũy nồng độ asparagin giảm so với thực vật đối chứng bao gồm các bước: (a) lấy mẫu từ thực vật cần được sàng lọc; (b) xác định nếu mẫu đã nêu bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây; và (c) xác định ít nhất là hàm lượng asparagin của thực vật đã nêu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật đột biến mà có nồng độ asparagin giảm so với thực vật đối chứng bao gồm các bước: (a) lấy mẫu

từ thực vật thứ nhất; (b) xác định nếu mẫu đã nêu bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây mà khiến nồng độ asparagin giảm; và (c) chuyển một hoặc nhiều đột biến sang thực vật thứ hai. (Các) đột biến có thể được chuyển sang thực vật thứ hai, sử dụng nhiều phương pháp khác nhau mà đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật – như bằng cách thiết kế di truyền, thao tác di truyền, chuyển gen vào cá thể khác, chọn giống thực vật, lai ngược và tương tự. Theo một phương án, thực vật thứ nhất là thực vật có trong tự nhiên. Theo một phương án, thực vật thứ hai có nền tảng di truyền khác với thực vật thứ nhất.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra thực vật đột biến mà có nồng độ asparagin giảm so với thực vật đối chứng bao gồm các bước: (a) lấy mẫu từ thực vật thứ nhất; (b) xác định nếu mẫu đã nêu bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây mà khiến nồng độ asparagin giảm; và (c) chuyển khác loài một hoặc nhiều đột biến từ thực vật thứ nhất sang thực vật thứ hai. Theo một phương án, bước chuyển khác loài bao gồm thực vật chọn giống, tùy ý là bao gồm lai ngược và tương tự. Theo một phương án, thực vật thứ nhất là thực vật có trong tự nhiên. Theo một phương án, thực vật thứ hai có nền tảng di truyền khác với thực vật thứ nhất. Theo một phương án, thực vật thứ nhất không là một cây trồng hoặc một cây trồng ưu tú. Theo một phương án, thực vật thứ hai không là một cây trồng hoặc một cây trồng ưu tú.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực vật đột biến (bao gồm thực vật đột biến cây trồng hoặc thực vật đột biến cây trồng ưu tú) thu được hoặc có thể thu được bằng các phương pháp được mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, "thực vật đột biến" có thể có một hoặc nhiều đột biến mà được định vị chỉ ở vùng đặc hiệu của thực vật – như bên trong trình tự của một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây. Theo phương án này, trình tự hệ gen còn lại của thực vật đột biến sẽ giống hoặc sẽ về cơ bản là giống với thực vật trước quá trình tạo đột biến.

Theo các phương án nhất định, các thực vật đột biến có thể có một hoặc nhiều đột biến mà được định vị trong nhiều hơn một vùng của thực vật – như bên trong trình tự của một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây và trong một hoặc nhiều vùng khác của hệ gen. Theo phương án này, trình tự hệ gen còn lại của thực vật đột biến sẽ không giống hoặc sẽ không về cơ bản là giống với thực vật trước quá trình tạo đột biến. Theo các phương án nhất định, các thực vật đột biến có thể không có một hoặc nhiều

đột biến trong một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, bốn hoặc nhiều hoặc năm hoặc nhiều exon của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc có thể không có một hoặc nhiều đột biến trong một hoặc nhiều, hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, bốn hoặc nhiều hoặc năm hoặc nhiều intron của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc có thể không có một hoặc nhiều đột biến trong promotơ của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc có thể không có một hoặc nhiều đột biến trong vùng 3' không dịch mã của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc có thể không có một hoặc nhiều đột biến trong vùng 5' không dịch mã của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc có thể không có một hoặc nhiều đột biến trong vùng mã hóa của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc có thể không có một hoặc nhiều đột biến trong vùng không mã hóa của (các) polynucleotit được mô tả ở đây; hoặc tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều, ba hoặc nhiều, bốn hoặc nhiều, năm hoặc nhiều; hoặc sáu hoặc nhiều phần của chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật bao gồm đột biến trong gen mã hóa polynucleotit được mô tả ở đây bao gồm: (a) cho thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật làm đối tượng của quá trình tạo đột biến; (b) thu mẫu axit nucleic từ thực vật đã nêu, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật hoặc các thế hệ sau của chúng; và (c) xác định trình tự axit nucleic của gen mã hóa polynucleotit được mô tả ở đây hoặc biến thể hoặc mảnh của chúng, trong đó sự khác nhau trong trình tự đã nêu là sự thể hiện cho một hoặc nhiều đột biến ở đó.

Các protein ngón tay kẽm còn có thể được sử dụng để điều biến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, trình tự ADN hệ gen bao gồm một phần hoặc toàn bộ trình tự mã hóa của polynucleotit được thay đổi bằng sự tạo đột biến do nucleaza ngón tay kẽm. Trình tự ADN hệ gen được tìm kiếm một vị trí độc nhất cho sự gắn kết với protein ngón tay kẽm. Ngoài ra, trình tự ADN hệ gen tìm kiếm hai vị trí độc nhất cho sự gắn kết với protein ngón tay kẽm, trong đó cả hai vị trí ở các mạch đối diện và gần nhau, ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc nhiều cặp bazơ riêng. Theo đó, sáng chế tạo ra các protein ngón tay kẽm mà liên kết với các polynucleotit.

Protein ngón tay kẽm có thể được thiết kế để nhận biết vị trí đích được chọn trong gen. Protein ngón tay kẽm có thể bao gồm bất kỳ tổ hợp nào của các motif được biến đổi từ các miền gắn kết ADN ngón tay kẽm tự nhiên và các miền gắn kết ADN ngón tay

kẽm không tự nhiên bởi sự cắt ngắn hoặc kéo dài hoặc quá trình tạo đột biến định hướng vị trí đi kèm với phương pháp chọn lọc như, nhưng không chỉ giới hạn ở, chọn lọc hiển thị thể thực khuẩn, chọn lọc lai vi khuẩn hai pha hoặc chọn lọc lai vi khuẩn một pha. Thuật ngữ "miền gắn kết ADN ngón tay kẽm không tự nhiên" dùng để chỉ miền gắn kết ADN ngón tay kẽm mà gắn kết với một trình tự gồm ba cặp bazơ bên trong axit nucleic đích và miền gắn kết ADN ngón tay kẽm này không có trong tế bào hoặc sinh vật mang axit nucleic mà được biến đổi. Các phương pháp thiết kế protein ngón tay kẽm mà liên kết với các trình tự nucleotit là độc nhất đối với gen đích đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Nucleaza ngón tay kẽm có thể được xây dựng bằng cách tạo ra sự dung hợp của polynucleotit thứ nhất mã hóa protein ngón tay kẽm mà gắn kết với polynucleotit, và polynucleotit thứ hai mã hóa endonucleaza không đặc hiệu, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, cái thuộc endonucleaza loại IIS. Protein dung hợp giữa protein ngón tay kẽm và nucleaza có thể chứa trình tự đệm bao gồm hai cặp bazơ hoặc ngoài ra, trình tự đệm này có thể bao gồm ba, bốn, năm, sáu, bảy hoặc nhiều cặp bazơ. Theo các phương án khacsm nucleaza ngón tay kẽm tạo ra một đứt gãy mạch đôi trong vùng điều hòa, vùng mã hóa, hoặc vùng không mã hóa của trình tự ADN hệ gen của polynucleotit và dẫn đến sự giảm mức độ sự biểu hiện của polynucleotit, hoặc giảm hoạt tính của protein được mã hóa bởi chúng. Sự phân cắt bằng các nucleaza ngón tay kẽm thường dẫn đến sự xóa ADN ở vị trí nhận biết sau khi sửa chữa ADN bằng cách nối đầu không tương đồng.

Theo các phương án khác, protein ngón tay kẽm có thể được chọn từ trình tự điều hòa của polynucleotit. Cụ thể hơn là, trình tự điều hòa này có thể bao gồm vị trí khởi đầu phiên mã, codon bắt đàu, vùng của exon, biên của exon-intron, trình tự kết thúc, hoặc codon kết thúc. Theo đó, sáng chế tạo ra thực vật hoặc các tế bào thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến, được tạo ra bởi sự tạo đột biến do nucleaza ngón tay kẽm trong vùng lân cận hoặc bên trong một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây, và các phương pháp để tạo ra thực vật hoặc tế bào thực vật này bằng sự tạo đột biến do nucleaza ngón tay kẽm. Các phương pháp để vận chuyển protein ngón tay kẽm và nucleaza ngón tay kẽm đến thực vật tương tự với cái được mô tả dưới đây để vận chuyển các meganucleaza.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phương pháp để tạo ra các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc các thực vật được biến

đổi di truyền khác mà sử dụng các meganucleaza, như I-CreI. Các meganucleaza có trong tự nhiện cũng như các meganucleaza tái tổ hợp có thể được sử dụng để gây ra một cách đặc hiệu sự đứt gãy mạch đôi ở một vị trí đơn hoặc ở tương đối ít vị trí trong ADN hệ gen của thực vật để cho phép sự gián đoán một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây. Meganucleaza có thể là meganucleaza được thiết kế với các đặc tính nhận biết ADN được thay đổi. Các protein meganucleaza có thể được vận chuyển vào trong các tế bào thực vật bằng nhiều cơ chế khác nhau đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Sáng chế còn bao gồm việc sử dụng các meganucleaza để bất hoạt (các) polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) trong tế bào thực vật hoặc thực vật. Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp bất hoạt polynucleotit trong thực vật, sử dụng meganucleaza bao gồm: a) tạo ra tế bào thực vật chứa polynucleotit như được mô tả ở đây; (b) đưa meganucleaza hoặc cấu trúc mã hóa meganucleaza vào trong tế bào thực vật đã nêu; và (c) cho phép meganucleaza này về cơ bản là bất hoạt (các) polynucleotit này.

Các meganucleaza có thể được sử dụng để phân cắt các vị trí nhận biết meganucleaza bên trong các vùng mã hóa của polynucleotit. Sự phân cắt như vậy thường dẫn đến sự xóa ADN ở vị trí nhận biết meganucleaza sau khi sửa chữa ADN đột biến bằng cách nối đầu không tương đồng. Các đột biến này trong trình tự mã hóa gen thường là đủ để bất hoạt gen. Phương pháp này để thay đổi tế bào thực vật bao gồm, đầu tiên, vận chuyển băng biểu hiện meganucleaza đến tế bào thực vật mà sử dụng phương pháp biến nạp thích hợp. Để có hiệu suất cao nhất, mong muốn là nối băng biểu hiện meganucleaza với marker chọn lọc được và chọn lọc các tế bào được biến nạp thành công khi có mặt của chất chọn lọc. Phương án tiếp cận này sẽ dẫn đến sự cài băng biểu hiện meganucleaza vào hệ gen, tuy nhiên, không mong muốn nếu thực vật này có khả năng yêu cầu sự chấp nhận điều hòa. Trong các trường hợp này, băng biểu hiện meganucleaza (và gen marker chọn lọc được, được liên kết) có thể được cách ly trong các thế hệ thực vật tiếp theo sử dụng các kỹ thuật chọn giống thông thường. Ngoài ra, các tế bào thực vật có thể ban đầu là được biến nạp băng biểu hiện meganucleaza mà thiếu marker chọn lọc được và có thể được sinh trưởng trong môi trường thiếu chất chọn lọc. Trong các điều kiện này, một phần của các tế bào được xử lý sẽ tiếp nhận băng biểu hiện meganucleaza và sẽ biểu hiện meganucleaza được thiết kế một cách tạm thời mà không cài băng biểu hiện meganucleaza này vào hệ gen. Bởi vì nó không tính đến hiệu

quả biến nạp, quá trình biến nạp tiếp sau này yêu cầu số lượng lớn hơn các tế bào được xử lý, được sàng lọc để thu được sự thay đổi hệ gen mong muốn. Phương án tiếp cận trên còn có thể được áp dụng để thay đổi tế bào thực vật khi sử dụng protein ngón tay kẽm hoặc nucleaza ngón tay kẽm.

Sau khi chuyển băng biểu hiện meganucleaza, các tế bào thực vật được sinh trưởng, ban đầu là, trong các điều kiện mà điển hình đối với quy trình biến nạp cụ thể được sử dụng. Điều này có thể có nghĩa là các tế bào được biến nạp đang sinh trưởng trong môi trường ở nhiệt độ dưới 26˚C, thường là trong bóng tối. Các điều kiện tiêu chuẩn này có thể được sử dụng trong một khoảng thời gian, tốt hơn là 1-4 ngày, để cho phép tế bào thực vật hồi phục lại từ quá trình biến nạp. Ở bất kỳ thời điểm nào sau giai đoạn hồi phục ban đầu này, nhiệt độ tăng trưởng có thể có thể được tăng lên để kích thích hoạt tính của meganucleaza được thiết kế để phân cắt và gây đột biến vị trí nhận biết meganucleaza.

Với các ứng dụng nhất định, có thể mong muốn là loại bỏ chính xác polynucleotit này khỏi hệ gen của thực vật. Các ứng dụng này là có thể mà sử dụng cặp meganucleaza được thiết kế, mỗi meganucleaza được thiết kế này phân cắt một vị trí nhận biết meganucleaza ở một trong hai bên của vị trí xoán được dự tính. Các nucleaza tác động giống TAL (TALEN) mà có thể năng nhận biết và liên kết với gen và đưa một sự đứt gãy mạch đôi vào trong hệ gen cũng có thể được sử dụng. Do đó, theo một khía cạnh khác, các phương pháp để tạo ra các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc các thực vật được biến đổi di truyền khác như được mô tả ở đây sử dụng cácnucleaza tác động giống TAL được bao gồm.

Các gen mà đã được xác định là có liên quan đến sự tổng hợp asparagin trong quá trình xử lý trong giống Burely của *Nicotinia tabacum* có thể có khả năng áp dụng cho các thực vật khác và các giống thực vật khác. Do đó, sáng chế có thể được tái sử dụng ở các thực vật khác và các khả năng áp dụng cho việc chọn giống các dòng khác nhau.

Các thực vật thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thực vật và các hệ thống tế bào thực vật một lá mầm và hai lá mầm, bao gồm các loài từ một trong số các họ sau: Acanthaceae, Alliaceae, Alstroemeriaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Arecaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Bixaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Caryophyllaceae, Cephalotaxaceae,

Chenopodiaceae, Colchicaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Ephedraceae, Erythroxylaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Linaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Melanthiaceae, Musaceae, Myrtaceae, Nyssaceae, Papaveraceae, Pinaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Salicaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Taxaceae, Theaceae, hoặc Vitaceae.

Các loài thích hợp có thể bao gồm các thành viên thuộc các chi Abelmoschus, Abies, Acer, Agrostis, Allium, Alstroemeria, Ananas, Andrographis, Andropogon, Artemisia, Arundo, Atropa, Berberis, Beta, Bixa, Brassica, Calendula, Camellia, Camptotheca, Cannabis, Capsicum, Carthamus, Catharanthus, Cephalotaxus, Chrysanthemum, Cinchona, Citrullus, Coffea, Colchicum, Coleus, Cucumis, Cucurbita, Cynodon, Datura, Dianthus, Digitalis, Dioscorea, Elaeis, Ephedra, Erianthus, Erythroxylum, Eucalyptus, Festuca, Fragaria, GalanDo đó, Glycine, Gossypium, Helianthus, Hevea, Hordeum, Hyoscyamus, Jatropha, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Lycopodium, Manihot, Medicago, Mentha, Miscanthus, Musa, Nicotiana, Oryza, Panicum, Papaver, Parthenium, Pennisetum, Petunia, Phalaris, Phleum, Pinus, Poa, Poinsettia, Populus, Rauwolfia, Ricinus, Rosa, Saccharum, Salix, Sanguinaria, Scopolia, Secale, Solanum, Sorghum, Spartina, Spinacea, Tanacetum, Taxus, Theobroma, Triticosecale, Triticum, Uniola, Veratrum, Vinca, Vitis, và Zea.

Các loài thích hợp có thể bao gồm Panicum spp., Sorghum spp., Miscanthus spp., Saccharum spp., Erianthus spp., Populus spp., Andropogon gerardii (cỏ cuống xanh lớn), Pennisetum purpureum (cỏ voi), Phalaris arundinacea (sậy cỏ kim tước), Cynodon dactylon (cỏ bermuda), Festuca arundinacea (cỏ roi), Spartina pectinata (cỏ chăn nuôi đồng cỏ), Medicago sativa (cỏ linh lăng), Arundo donax (sậy khổng lồ), Secale cereale (cỏ lúa mạch), Salix spp. (liễu), Eucalyptus spp. (bạch đàn), Triticosecale (tiểu hắc mạch), bamboo, Helianthus annuus (hoa hướng dương), Carthamus tinctorius (hoa rum), Jatropha curcas (jatropha), Ricinus communis (cây thầu dầu), Elaeis guineensis (cây cọ), Linum usitatissimum (cây gai), Brassica juncea, Beta vulgaris (củ cải đường), Manihot esculenta (sắn), Lycopersicon esculentum (cà chua), Lactuca sativa (rau diếp), Musyclise alca (chuối), Solanum tuberosum (khoai tây), Brassica oleracea (bông cải, súp lơ, cải Brussels), Camellia sinensis (trà), Fragaria ananassa (dâu tây), Theobroma cacao (ca cao), Coffea ycliseca (cà phê), Vitis vinifera (nho), Ananas comosus (dứa), Capsicum annum (ớt chuông và ớt cay), Allium cepa (hành), Cucumis melo (dưa),

Cucumis sativus (dưa chuột), Cucurbita maxima (quả bí), Cucurbita moschata (quả bí), Spinacea oleracea (rau chân vịt), Citrullus lanatus (dưa hấu), Abelmoschus esculentus (đậu bắp), Solanum melongena (cà tím), Rosa spp. (hoa hồng), Dianthus caryophyllus (hoa cẩm chướng), Petunia spp. (hoa chi dã yên thảo), Poinsettia pulcherrima (hoa trạng nguyên), Lupinus albus (hoa đậu lupin), Uniola paniculata (yến mạch), cỏ ống (Agrostis spp.), Populus tremuloides (cây dương lá rung), Pinus spp. (thông), Abies spp. (linh sam), Acer spp. (cây thích), Hordeum vulgare (đại mạch), Poa pratensis (cỏ lam), Lolium spp. (cỏ đen) và Phleum pratense (cỏ đuôi mèo), Panicum virgatum (cỏ mềm), Sorghu75yclise75or (lúa miến, cỏ sudan), Miscanthus giganteus (cỏ chè vè), Saccharum sp. (cây mía đường), Populus balsamifera (poplar), Zea mays (ngô), Glycine max (đậu nành), Brassica napus (hạt cải), Triticum aestivum (lúa mì), Gossypium hirsutum (bông), Oryza sativa (lúa gạo), Helianthus annuus (hoa hướng dương), Medicago sativa (cỏ linh lăng), Beta vulgaris (củ cải đường), hoặc Pennisetum glaucum (cây kê ngọc trai).

Nhiều phương án khác nhau được hướng đến các thực vật hoặc các tế bào thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến được biến đổi để điều biến mức độ biểu hiện gen, nhờ đó, tạo ra thực vật hoặc tế bào thực vật – như cây thuốc lá hoặc tế bào của cây thuốc lá – trong đó, mức độ biểu hiện của polypeptit được điều biến bên trong các mô quan tâm so với đối chứng. Chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế có thể được áp dụng với loài bất kỳ của chi *Nicotiana*, bao gồm *N. rustica* và *N. tabacum* (ví dụ, LA B21, LN KY171, TI 1406, Basma, Galpao, Perique, Beinhart 1000-1, và Petico). Các loài khác bao gồm *N. acaulis, N. acuminata, N. africana, N. alata, N. ameghinoi, N. amplexicaulis, N. arentsii, N. attenuata, N. azambujae, N. benavidesii, N. benthamiana, N. bigelovii, N. bonariensis, N. cavicola, N. clevelandii, N. cordifolia, N. corymbosa, N. debneyi, N. excelsior, N. forgetiana, N. fragrans, N. glauca, N. glutinosa, N. goodspeedii, N. gossei, N. hybrid, N. ingulba, N. kawakamii, N. knightiana, N. langsdorffii, N. linearis, N. longiflora, N. maritima, N. megalosiphon, N. miersii, N. noctiflora, N. nudicaulis, N. obtusifolia, N. occidentalis, N. occidentalis subsp. hesperis, N. otophora, N. paniculata, N. pauciflora, N. petunioides, N. plumbaginifolia, N. quadrivalvis, N. raimondii, N. repanda, N. rosulata, N. rosulata subsp. ingulba, N. rotundifolia, N. setchellii, N. simulans, N. solanifolia, N. spegazzinii, N. stocktonii, N. suaveolens, N. sylvestris, N. thyrsiflora, N. tomentosa, N. tomentosiformis, N.*

trigonophylla, N. umbratica, N. undulata, N. velutina, N. wigandioides, và N. x sanderae.

Việc sử dụng các giống cây trồng thuốc lá và các thuốc lá giống cây trồng ưu tú cũng được bao gồm ở đây. Do đó, thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến có thể là giống thuốc lá hoặc giống cây trồng thuốc lá ưu tú mà bao gồm một hoặc nhiều gen chuyển, hoặc một hoặc nhiều đột biến di truyền hoặc tổ hợp của chúng. (Các) đột biến di truyền (ví dụ, một hoặc nhiều dạng đa hình) có thể là các đột biến mà không tồn tại tự nhiện trong giống thuốc lá hoặc giống cây trồng thuốc lá đơn lẻ (ví dụ, giống cây trồng thuốc lá ưu tú) hoặc có thể là (các) đột biến di truyền mà không có trong tự nhiên trong giống thuốc lá hoặc giống cây trồng thuốc lá đơn lẻ (ví dụ, giống cây trồng thuốc lá ưu tú).

Các giống *Nicotiana tabacum* đặc biệt hữu ích bao gồm cây thuốc lá loại Burley, loại màu tối, loại được làm khô bằng không khí nóng, và loại Oriental. Các ví dụ không giới hạn về các giống hoặc giống cây trồng là: BD 64, CC 101, CC 200, CC 27, CC 301, CC 400, CC 500, CC 600, CC 700, CC 800, CC 900, Coker 176, Coker 319, Coker 371 Gold, Coker 48, CD 263, DF911, DT 538 LC Galpao tobacco, GL 26H, GL 350, GL 600, GL 737, GL 939, GL 973, HB 04P, HB 04P LC, HB3307PLC, Hybrid 403LC, Hybrid 404LC, Hybrid 501 LC, K 149, K 326, K 346, K 358, K394, K 399, K 730, KDH 959, KT 200, KT204LC, KY10, KY14, KY 160, KY 17, KY 171, KY 907, KY907LC, KY14xL8 LC, Little Crittenden, McNair 373, McNair 944, msKY 14xL8, Narrow Leaf Madole, Narrow Leaf Madole LC, NBH 98, N-126, N-777LC, N-7371LC, NC 100, NC 102, NC 2000, NC 291, NC 297, NC 299, NC 3, NC 4, NC 5, NC 6, NC7, NC 606, NC 71, NC 72, NC 810, NC BH 129, NC 2002, Neal Smith Madole, OXFORD 207, PD 7302 LC, PD 7309 LC, PD 7312 LC, 'Periqe' tobacco, PVH03, PVH09, PVH19, PVH50, PVH51, R 610, R 630, R 7-11, R 7-12, RG 17, RG 81, RG H51, RGH 4, RGH 51, RS 1410, Speight 168, Speight 172, Speight 179, Speight 210, Speight 220, Speight 225, Speight 227, Speight 234, Speight G-28, Speight G-70, Speight H-6, Speight H20, Speight NF3, TI 1406, TI 1269, TN 86, TN86LC, TN 90, TN 97, TN97LC, TN D94, TN D950, TR (Tom Rosson) Madole, VA 309, VA359, AA 37-1, B13P, Xanthi (Mitchell-Mor), Bel-W3, 79-615, Samsun Holmes NN, KTRDC number 2 Hybrid 49, Burley 21, KY8959, KY9, MD 609, PG01, PG04, PO1, PO2, PO3, RG11, RG 8, VA509, AS44, Banket A1, Basma Drama B84/31, Basma I Zichna ZP4/B, Basma

Xanthi BX 2A, Batek, Besuki Jember, C104, Coker 347, Criollo Misionero, Delcrest, Djebel 81, DVH 405, Galpão Comum, HB04P, Hicks Broadleaf, Kabakulak Elassona, Kutsage E1, LA BU 21, NC 2326, NC 297, PVH 2110, Red Russian, Samsun, Saplak, Simmaba, Talgar 28, Wislica, Yayaldag, Prilep HC-72, Prilep P23, Prilep PB 156/1, Prilep P12-2/1, Yaka JK-48, Yaka JB 125/3, TI-1068, KDH-960, TI-1070, TW136, Basma, TKF 4028, L8, TKF 2002, GR141, Basma xanthi, GR149, GR153, Petit Havana. Các giống phụ chuyển hóa kém của các giống nêu trên, ngay cả khi không được xác định cụ thể ở đây, cũng được bao gồm.

Theo một phương án, giống kiểu Burley của *Nicotiana tabacum* được sử dụng.

Các thực vật khác mà thích hợp để sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, trà (*Camellia sinensis*).

Các phương án cũng hướng đến các chế phẩm và các phương pháp tạo ra thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, thực vật lai, hoặc thực vật chuyển gen mà đã được biến đổi để điều biến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của (các) polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây). Thuận lợi là, các thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, thực vật lai, hoặc thực vật chuyển gen thu được có thể là giống hoặc về cơ bản là giống về hình dạng bên ngoài với các thực vật đối chứng. Các đặc tính hiểu hình khác nhau như độ trưởng thành, số lượng lá trên một cây, chiều cao cuống, góc chèn lá, kích cỡ lá (rộng và dài) khoảng cách giữa các gióng, và tỷ lệ phiến lá-gân lá có thể được đánh giá bằng các quan sát hiện trường.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hạt của thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, thực vật lai hoặc thực vật chuyển gen được mô tả ở đây. Tốt hơn là, hạt này là hạt của cây thuốc lá. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến hạt phấn hoặc noãn của thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, thực vật lai hoặc thực vật chuyển gen được mô tả ở đây. Ngoài ra, sáng chế đề xuất thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, thực vật lai hoặc thực vật chuyển gen như được mô tả ở đây mà ngoài ra, bao gồm cây bất dục đực mang axit nucleic.

Sáng chế còn đề xuất môi trường nuôi cấy mô của các tế bào có khả năng tái sinh của thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, thực vật lai, hoặc thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của nó như được mô tả ở đây, mà môi trường nuôi cấy này tái tạo các thực vật có khả năng biểu hiện tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý của thực vật bố mẹ. Các tế bào có khả năng tái sinh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các tế bào từ

lá, hạt phấn, phôi, các lá mầm, trụ dưới lá mầm, rễ, đầu rễ, bao phấn, hoa và bộ phận của chúng, noãn, ngọn, thân, cành, ruột cây và quả nang hoặc mô sẹo hoặc tế bào trần được bắt nguồn từ đó.

Vẫn theo phương án khác, sáng chế đề cập đến nguyên liệu thực vật đã được làm khô – như lá được làm khô hoặc cây thuốc lá được làm khô - bắt nguồn từ hoặc có thể bắt nguồn từ thực vật hoặc tế bào chuyển gen hoặc không có trong tự nhiên, đột biến, trong đó sự biểu hiện của một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi chúng được giảm xuống và dẫn đến nồng độ của asparagin trong đó được giảm xuống.

Thích hợp là, hình dáng bên ngoài của thực vật đã nêu (ví dụ, lá) về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Thích hợp là, thực vật này là cây thuốc lá.

Các phương án cũng hướng đến các chế phẩm và các phương pháp tạo ra các thực vật hoặc các tế bào thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến mà đã được biến đổi để điều biến sự biểu hiện hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polynucleotit hoặc polypeptit được mô tả ở đây mà có thể khiến thực vật hoặc các thành phần của thực vật (ví dụ, lá – như lá được xử lý hoặc làm khô) hoặc các tế bào thực vật có nồng độ asparagin giảm.

Các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến thu được theo các phương pháp được mô tả ở đây có thể giống hoặc về cơ bản là giống về hình dạng bên ngoài với các thực vật đối chứng. Theo một phương án, trọng lượng của lá của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Theo một phương án, số lượng lá của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Theo một phương án, trọng lượng của lá và số lượng lá của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Theo một phương án, chiều cao thân của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như các thực vật đối chứng ở, ví dụ, một, hai hoặc ba hoặc nhiều tháng sau khi trồng trên cánh đồng thực vật chuyển hoặc 10, 20, 30 hoặc 36 hoặc nhiều ngày sau khi tỉa ngọn. Ví dụ, độ cao thân của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến không nhỏ hơn độ cao thân của các thực vật đối chứng. Theo một phương án khác, hàm lượng diệp lục của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Theo một phương án khác, độ cao thân của các thực vật

chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như các thực vật đối chứng và hàm lượng diệp lục của các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như các thực vật đối chứng. Theo một phương án khác, kích thước hoặc dạng hoặc số lượng hoặc màu sắc của lá của các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Thích hợp là, thực vật này là cây thuốc lá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều biến (*ví dụ*, làm giảm) lượng asparagin trong ít nhất là một phần của thực vật (ví dụ, lá – như lá được xử lý hoặc làm khô – hoặc trong cây thuốc lá), bao gồm các bước: (i) điều biến (*ví dụ*, làm giảm) sự biểu hiện hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây, thích hợp là, trong đó (các) polypeptit này được mã hóa bởi trình tự polynucleotit tương ứng được mô tả ở đây; (ii) đo hàm lượng asparagin trong ít nhất làmột phần (ví dụ, lá – như lá được sấy khô) của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến thu được trong bước (i); và (iii) xác định thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến, trong đó hàm lượng asparagin bên trong đó đã được giảm xuống khi so sánh với thực vật đối chứng. Thích hợp là, hình dáng bên ngoài của thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến đã nêu về cơ bản là giống như thực vật đối chứng. Thích hợp là, thực vật này là cây thuốc lá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp giảm lượng asparagin trong ít nhất là một phần của nguyên liệu thực vật được làm khô hoặc sấy khô – như lá được xử lý hoặc làm khô - bao gồm các bước: (i) làm giảm sự biểu hiện hoặc hoạt tính của một hoặc nhiều polypeptit được mô tả ở đây, thích hợp là, trong đó (các) polypeptit này được mã hóa bởi trình tự polynucleotit tương ứng được mô tả ở đây; (ii) thu hoặc nguyên liệu thực vật – như một hoặc nhiều lá - và xử lý hoặc làm khô trong một khoảng thời gian; (iii) đo hàm lượng asparagin trong ít nhất là một phần của nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô) thu được trong bước (ii); và (iv) xác định nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô, trong đó hàm lượng asparagin bên trong đó đã được giảm xuống khi so sánh với thực vật đối chứng.

Sự giảm biểu hiện so với đối chứng có thể là từ khoảng 5% đến khoảng 100%, hoặc sự giảm ít nhất là 10%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất

là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc 100%, mà bao gồm sự giảm hoạt động phiên mã hoặc biểu hiện polynucleotit hoặc biểu hiện polypeptit hoặc sự kết hợp của chúng.

Sự giảm hoạt tính so với đối chứng có thể là từ khoảng 5% đến khoảng 100%, hoặc sự giảm ít nhất là 10%, ít nhất là 20%, ít nhất là 25%, ít nhất là 30%, ít nhất là 40%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 75%, ít nhất là 80%, ít nhất là 90%, ít nhất là 95%, ít nhất là 98%, hoặc 100%.

Các polynucleotit và các cấu trúc tái tổ hợp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để điều biến sự biểu hiện của các enzym được mô tả ở đây trong các loài thực vật quan tâm, thích hợp là, thuốc lá.

Một số phương pháp dựa trên polynucleotit có thể được sử dụng để tăng sự biểu hiện gen trong thực vật và các tế bào thực vật, ví dụ. Bằng cách ví dụ, cấu trúc, vectơ hoặc vectơ biểu hiện mà tương thích với thực vật được biến nạp có thể được tạo ra mà bao gồm gen quan tâm cùng với promotơ nằm phía trước mà có khả năng biểu hiện quá mức gen trong thực vật hoặc tế bào thực vật. Các promotơ ví dụ được mô tả ở đây. Sau khi biến nạp và khi được sinh trưởng trong các điều kiện thích hợp, promotơ có thể điều khiển biểu hiện để điều biến (ví dụ, giảm) nồng độ của enzym này trong thực vật, hoặc trong mô đặc hiệu của chúng. Theo một phương án ví dụ, vectơ mang một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) được tạo ra để biểu hiện quá mức gen này trong thực vật hoặc tế bào thực vật. Vectơ này mang promotơ thích hợp – như promotơ 35S CaMV từ virut khảm súp lơ- nằm phía trước gen chuyển mà điều khiển sự biểu hiện cơ định của nó trong tất cả các mô của thực vật này. Vectơ này còn mang gen kháng kháng sinh để tạo ra sự chọn lọc các mô sẹo và các dòng tế bào được biến nạp.

Nhiều phương án khác nhau được hướng đến các phương pháp để giảm mức độ biểu hiện của một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây bằng cách cài nhiều bản sao của polynucleotit này vào trong hệ gen của thực vật, bao gồm: biến nạp vào tế bào chủ thực vật vectơ biểu hiện mà bao gồm promotơ được liên kết có thể điều khiển được với một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây. Polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit tái tổ hợp có thể là polypeptit nguyên gốc, hoặc có thể là dị hợp với tế bào.

Thực vật mang alen đột biến của một hoặc nhiều polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) có thể được sử dụng trong chương trình chọn giống thực vật để tạo ra các dòng, giống và thể lai hữu ích. Cụ thể, alen đột

biến được thẩm nhập vào các giống quan trọng về thương mại nêu trên. Do đó, sáng chế đề xuất các phương pháp để chọn giống thực vật, mà bao gồm lai thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên hoặc thực vật chuyển gen như được mô tả ở đây với thực vật mang nhận dạng di truyền khác. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước lai thực vật con cháu với một thực vật khác, và tùy ý là lặp lại bước lai cho đến khi thu được thực vật con cháu có các tính trạng di truyền hoặc nền tảng di truyền mong muốn. Một mục đích đạt được từ các phương pháp chọn giống này là để đưa tính trạng mong muốn vào các giống, dòng chọn giống, thể lai hoặc giống cây trồng khác, cụ thể là những cái được quan tâm về thương mại. Một mục đích khác là để tạo điều kiện thuận lợi cho việc xếp chồng các biến đổi di truyền của các gen khác nhau trong một giống thực vật đơn, các dòng, thể lai hoặc giống cây trồng. Ghép đôi nội đặc hiệu cũng như liên đặc hiệu được bao gồm. Các thực vật con cháu mà thu được từ các phép lai này, còn được gọi là các dòng chọn tạo, là các ví dụ về các thực vật không có trong tự nhiên theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương án tạo ra thực vật không có trong tự nhiên bao gồm: (a) lai thực vật đột biến hoặc chuyển gen với thực vật thứ hai để tạo ra hạt giống của cây thuốc lá; (b) trồng hạt giống này trong các điều kiện sinh trưởng, để tạo ra thực vật không có trong tự nhiên. Phương pháp này có thể còn bao gồm: (c) lai thế hệ trước của thực vật không có trong tự nhiên với chính nó hoặc với một thực vật khác để tạo ra hạt giống; (d) trồng hạt giống thu được ở bước (c) trong các điều kiện sinh trưởng, để tạo ra các thực vật không có trong tự nhiên khác; và (e) lặp lại các bước lai (c) và bước trồng (d) nhiều lần để tạo ra các thế hệ tiếp theo của các thực vật không có trong tự nhiên. Phương pháp này có thể tùy ý là bao gồm trước bước (a), bước tạo ra thực vật bố mẹ mà bao gồm sự nhận dạng di truyền được đặc trưng hóa và không giống với thực vật đột biến hoặc chuyển gen. Theo một số phương án, phụ thuộc vào kế hoạch chọn giống, các bước lai và bước trồng được lặp lại từ 0 đến 2 lần, từ 0 đến 3 lần, từ 0 đến 4 lần, 0 to 5 lần, từ 0 đến 6 lần, từ 0 đến 7 lần, từ 0 đến 8 lần, từ 0 đến 9 lần hoặc từ 0 đến 10 lần, để tạo ra các thế hệ của các thực vật không có trong tự nhiên. Lai ngược là một ví dụ của phương pháp như vậy trong đó thực vật con cháu được lai với một trong số các thực vật bố mẹ của nó hoặc một thực vật khác tương tự về di truyền với thực vật bố mẹ của nó, để thu được thực vật con cháu trong thế hệ kế tiếp mà có nhận dạng di truyền gần hơn với nhận dạng di truyền của các thực vật bố mẹ. Các kỹ thuật để chọn giống thực vật, cụ thể là chọn giống thực vật, được biết rõ và có thể được sử dụng trong

các phương pháp theo sáng chế. Sáng chế còn tạo ra các thực vật không có trong tự nhiên được tạo ra bởi các phương pháp này. Các phương án nhất định loại trừ bước chọn lọc thực vật.

Theo một số phương án của các phương pháp được mô tả ở đây, các dòng thu được từ việc chọn giống và sàng lọc các gen biến thể được đánh giá trên cánh đồng sử dụng các quy trình thực địa tiêu chuẩn. Các kiểu gen đối chứng mà bao gồm thực vật bố mẹ không chứa đột biến ban đầu, được bao gồm và các lối đi được bố trí trên cánh đồng theo một thiết kế khối hoàn toàn, ngẫu nhiên hoặc thiết kế thực địa thích hợp khác. Đối với thuốc lá, các thực hành sản xuất nông nghiệp tiêu chuẩn được sử dụng, ví dụ, thuốc lá được thu hoạch, cân, được lấy mẫu để kiểm tra hóa học và các kiểm tra khác trước và trong quá trình làm khô hoặc sấy khô. Các phân tích thống kê các dữ liệu này được tiến hành để xác nhận độ giống nhau giữa các dòng được chọn với dòng bố mẹ. Các phân tích di truyền học tế bào của các thực vật được chọn tùy ý là được thực hiện để xác nhận sự bổ sung nhiễm sắc thể và các mối quan hệ nhiễm sắc thể.

ADN in dấu, đa hình đơn nucleotit, các marker tiểu vệ tinh, hoặc các công nghệ tương tự có thể được sử dụng trong chương trình chọn giống chọn lọc được hỗ trợ bởi marker (MAS: marker-assisted selection) để chuyển hoặc gây giống các alen đột biến của gen vào trong các thực vật khác, như được mô tả ở đây. Ví dụ, nhà tạo giống có thể tạo ra các quần thể cách ly từ các bước lai hóa kiểu gen mà chứa alen đột biến với kiểu gen mong muốn về nông nghiệp. Các thực vật thuộc thế hệ F2 hoặc thế hệ lai ngược có thể được sàng lọc, sử dụng chất chỉ thị được phát triển từ trình tự hệ gen hoặc mảnh của chúng, sử dụng một trong các kỹ thuật được liệt kê ở đây. Các thực vật được xác định là có alen đột biến có thể được lai ngược hoặc tự thụ phấn để tạo ra quần thể thứ hai được chọn lọc. Phụ thuộc vào kiểu kế thừa kỳ vọng hoặc kỹ thuật MAS được sử dụng, có thể cần phải tự thụ phấn các thực vật được chọn trước mỗi chu kỳ lai ngược để hỗ trợ sự xác định các cá thể thực vật mong muốn. Lai ngược hoặc quy trình tạo giống khác có thể được lặp lại cho đến khi thu được kiểu hình mong muốn của thực vật bố mẹ hồi quy.

Trong quá trình chọn giống, các phép lai thành công tạo ra các thực vật F1 hữu thụ. Các thực vật F1 được chọn có thể được lai với một trong số các thực vật bố mẹ, và các thực vật thế hệ lai ngược thứ nhất được tự thụ phấn để tạo ra quần thể mà được sàng lọc một lần nữa sự biểu hiện gen biến thể (ví dụ, bản rỗng của gen). Quy trình lai ngược, tự thụ phấn, và sàng lọc được lặp lại, ví dụ, ít nhất là 4 lần cho đến khi các quy trình

sàng lọc cuối cùng tạo ra thực vật hữu thụ và giống ở mức chấp nhận được với thực vật bố mẹ hồi quy. Thực vật này, nếu mong muốn, được tự thụ phấn và thực vật con cháu, sau đó, được sàng lọc một lần nữa để xác nhận liệu thực vật này có thể hiện sự biểu hiện gen biến đổi. Theo một số phương án, quần thể thực vật trong thế hệ F2 được sàng lọc sự biểu hiện gen biến đổi, ví dụ, thực vật được xác định là không biểu hiện polypeptit do vắng mặt gen này theo các phương pháp tiêu chuẩn, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp PCR với các đoạn mồi dựa trên thông tin trình tự nucleotit đối với (các) polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây).

Các giống lai có thể được tạo ra bằng cách ngăn cản sự tự thụ phấn của các thực vật đực thuộc thế hệ bố mẹ (tức là, hạt giống bố mẹ) của giống thứ nhất, cho phép hạt phấn từ các thực vật đực thuộc thế hệ bố mẹ của giống thứ hai thụ phấn với các thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ, và cho phép các hạt lai F1 tạo ra các thực vật cái. Sự tự thụ phấn của các thực vật cái có thể được ngăn cản bằng việc cắt hoa ở giai đoạn sớm trong quá trình phát triển của hoa. Ngoài ra, sự tạo thành hạt phấn có thể được ngăn cản đối với thực vật cái làm thế hệ bố mẹ mà sử dụng dạng cây đực bất thụ. Ví dụ, cây đực bất thụ có thể được tạo ra bằng sự gây bất thu đực tế bào chất (CMS: cytoplasmic cây bất thụ đực), hoặc gây bất thu đực chuyển gen, trong đó gen chuyển ức chế sự phát triển vi thể và/hoặc sự tạo thành hạt phấn, hoặc tự không tương thích. Các thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ chứa CMS đặc biệt hữu ích. Theo các phương án, trong đó, các thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ là CMS, hạt phấn được thu hoặc từ các thực vật hữu thụ và được thụ phấn thủ công với đầu nhụy của các thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ CMS, và hạt F1 tạo thành được thu hoạch.

Các giống và các dòng được mô tả ở đây có thể được sử dụng để tạo ra thể lai F1 lai đơn. Theo các phương án này, các thực vật của giống bố mẹ có thể được trồng như các quần thể tiếp giáp về cơ bản là đồng hợp để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình thụ phấn chéo tự nhiên giữa các thực vật đực thuộc thế hệ bố mẹ với các thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ. Hạt F1 được tạo ra trên các thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ được thu hoạch chọn lọc bằng các cách thông thường. Một trong những cách đó cũng có thể trồng chung hai giống thực vật bố mẹ và thu hoạch hỗn hợp hạt lai F1 được tạo ra trên thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ và hạt được tạo ra sau khi thực vật đực thuộc thế hệ bố mẹ như là kết quả của quán trình tự thụ phấn. Ngoài ra, các phép lai ba hướng có thể được thực hiện trong đó thể lai F1 lai đơn được sử dụng làm thực vật cái thuộc thế hệ bố mẹ và

được lai với thực vật đực thuộc thế hệ bố mẹ khác. Theo một cách khác, các thể lai kép có thể được tạo ra, trong đó thế hệ con cháu F1 của hai phép lai đơn khác nhau được lai với nhau.

Quần thể các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến có thể được sàng lọc hoặc được chọn lọc để tìm các thành viên của quần thể này mà có tính trạng hoặc kiểu hình mong muốn. Ví dụ, quần thế thực vật con cháu của một sự kiện biến nạp đơn có thể được sàng lọc để tìm các thực vật có mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính mong muốn của (các) polypeptit được mã hóa bởi chúng. Các phương pháp vật lý và hóa sinh có thể được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện hoặc hoạt tính. Các phương pháp này bao gồm phân tích Southern hoặc khuếch đại PCR để phát hiện polynucleotit; lai Northern blot, bảo vệ S1 RNaza, mồi-kéo dài, hoặc khuếch đại RT-PCR để phát hiện các sản phẩm phiên mã ARN; các thử nghiệm enzym để phát hiện hoạt tính enzym hoặc ribozym của các polypeptit và các polynucleotit; và điện di gel protein, lai Western blot, kết tủa miễn dịch, và các thử nghiệm miễn dịch liên kết enzym để phát hiện polypeptit. Các kỹ thuật khác như lai tại chỗ (in situ), nhuộm enzym, và nhuộm miễn dịch và các thử nghiệm enzym cũng có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt hoặc sự biểu hiện hoặc hoạt tính của các polypeptit hoặc các polynucleotit.

Các tế bào thực vật và các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến được mô tả ở đây bao gồm một hoặc nhiều polynucleotit tái tổ hợp, một hoặc nhiều polynucleotit cấu trúc, một hoặc nhiều ARN mạch đôi, một hoặc nhiều thể liên hợp hoặc một hoặc nhiều vecto/vectơ biểu hiện.

Không có giới hạn, các thực vật được mô tả ở đây có thể được biến đổi cho các mục đích khác trước hoặc sau khi sự biểu hiện hoặc hoạt tính đã được điều biến theo sáng chế. Một hoặc nhiều biến đổi di truyền sau có thể có trong các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến. Theo một phương án, một hoặc nhiều gen mà có liên quan đến sự chuyển đổi các chất trung gian chuyển hóa nitơ mà tạo ra các thực vật (như lá) mà khi được làm khô, tạo ra mức độ của ít nhất là một nitrosamin đặc hiệu thuốc lá thấp hơn các thực vật đối chứng. Các ví dụ không giới hạn về các gen mà có thể được biến đổi bao gồm, như được mô tả ở đây, các gen mã hóa asparagin synthetaza, như *CYP82E4*, *CYP82E5* và *CYP82E10* mà tham gia vào sự chuyển hóa nicotin thành nornicotin và được mô tả trong WO2006091194, WO2008070274, WO2009064771 và PCT/US2011/021088 và như được mô tả ở đây. Theo một phương án khác, một hoặc

nhiều gen mà có liên quan đến sự hấp thu kim loại nặng hoặc vận chuyển kim loại nặng được biến đổi mà tạo ra thực vật hoặc các bộ phận của các thực vật (như lá) có hàm lượng kim loại nặng thấp hơn các thực vật đối chứng hoặc các bộ phận của chúng mà không có (các) biến đổi này. Các ví dụ không giới hạn bao gồm các gen thuộc họ protein kèm theo tính kháng đa dược chất, họ chất thúc đẩy khuếch tán cation (CDF), họ protein giống như Zrt, Irt (ZIP), họ chất trao đổi cation (CAX), họ chất vận chuyển đồng (COPT), họ các ATPaza loại P kim loại nặng (ví dụ, HMA, như được mô tả trong WO2009074325), họ các chất đồng đẳng của các protein đại thực bào kèm theo tính kháng tự nhiên (NRAMP), và họ chất vận chuyển băng liên kết ATP (ABC) (ví dụ, MRP, như được mô tả trong WO2012/028309, mà tham gia vào quá trình vận chuyển các kim loại nặng, như camidi. Thuật ngữ kim loại nặng khi được sử dụng ở đây bao gồm các kim loại chuyển tiếp. Các ví dụ về các biến đổi khác bao gồm tính kháng chất diệt cỏ, ví dụ, glyphosat là thành phần hoạt tính của một phổ rộng của nhiều loại chất diệt cỏ. Các thực vật chuyển gen kháng glyphosat đã được phát triển bằng cách chuyển gen *aroA* (glyphosat EPSP synthetaza từ *Salmonella typhimurium* và *E.coli*). Các thực vật kháng sulphonylure đã được tạo ra bằng cách biến nạp gen *ALS* (axetolactat synthetaza) đột biến từ Arabidopsis. Protein OB của hệ thống quang II từ *Amaranthus hybridus* đột biến đã được biến nạp vào trong các thực vật để tạo ra các thực vật chuyển gen kháng antrazin; và các thực vật chuyển gen kháng bromoxynil đã được tạo ra bằng sự kết hợp gen *bxn* từ vi khuẩn *Klebsiella pneumoniae.* Một sự biến đổi ví dụ khác tạo ra thực vật kháng côn trùng. Chất độc *Bacillus thuringiensis* (Bt) có thể mang lại một cách trì hoãn hiệu quả sự xuất hiện của sinh vật gây hại kháng Bt, như hiện được minh chứng trong bông cải xanh mà các gen *cry1Ac* và *cry1C* Bt hình chópđiều khiển bướm đêm lưng có sọc hình thoi (diamondback moth) kháng lại một trong hai đơn protein này và trì hoãn đáng kể sự tiến hóa của các côn trùng kháng thuốc. Một sự biến đổi ví dụ khác tạo ra thực vật kháng lại các bệnh do các tác nhân gây bệnh (ví dụ, virut, vi khuẩn, nấm). Các thực vật biểu hiện gen *Xa21* (kháng lại bệnh bạc lá do vi khuẩn) với các thực vật biểu hiện cả gen dung hợp Bt và gen chitinaza (kháng lại sâu đục thân màu vàng và dung hợp vỏ bọc ngoài) đã được thiết kế. Một sự biến đổi ví dụ khác dẫn đến khả năng sinh sản bị thay đổi, như cây bất thụ đực. Một sự biến đổi ví dụ khác tạo ra các thực vật mà chống chịu được áp lực vô sinh (ví dụ, hạn hán, nhiệt độ, độ muối), và các thực vật chuyển gen chống chịu đã được tạo ra bằng cách chuyển enzym axyl glyxerol phosphat

từ Arabidopsis; các gen mã hóa manitol dehydrogenaza và sorbitol dehydrogenaza mà có liên quan trong quá trình tổng hợp manitol và sorbitol cải thiện tính chịu hạn. Các thay đổi ví dụ khác có thể tạo ra các thực vật có sự dự trữ protein và dầu được cải thiện, các thực vật có hiệu suất quang hợp được tăng cường, các thực vật có thời gian sử dụng kép dài, và các thực vật kháng nấm; các thực vật mã hóa enzym có liên quan đến sự sinh tổng hợp các alkaloit. Các thực vật chuyển gen trong đó sự biểu hiện của S-adenosyl-L-methionin (SAM) và/hoặc xystathionin gamma-synthaza (CGS) đã được điều biến cũng được bao gồm.

Một hoặc nhiều tính trạng này cũng có thể được thấm nhập vào trong các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến từ giống cây trồng khác hoặc có thể được biến nạp trực tiếp vào nó. Sự thẩm nhập (các) tính trạng vào các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến có thể đạt được bằng bất kỳ phương pháp chọn giống thực vật nào đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ, chọn giống theo phả hệ, lai ngược, chọn giống đơn bội kép, và tương tự (xem, Wernsman, E. A, và Rufty, R. C. 1987. Chương Mười bảy. Tobacco. các trang 669-698 trong: *Cultivar Development. Crop Species.* W. H. Fehr (ed.), MacMillan Publishing Co, Inc., New York, N.Y 761 pp.). Các kỹ thuật dựa trên sinh học phân tử nêu trên, cụ thể là RFLP và các marker tiểu vệ tinh, có thể được sử dụng trong các phép lai ngược này để xác định các thực vật con cháu mà có mức độ tương đồng di truyền cao nhất với thực vật bố mẹ tái tục. Điều này cho phép nó thúc đẩy sự tạo ra các giống có độ tương đồng di truyền ít nhất là 90%, tốt hơn là ít nhất là 95%, tốt hơn là ít nhất là 99% với thực vật bố mẹ tái tục, tốt hơn nữa là tương đồng về di truyền với thực vật bố mẹ tái tục, và ngoài ra còn bao gồm (các) tính trạng được thẩm nhập từ thực vật bố mẹ cho. Sự xác định độ tương đồng di truyền có thể được dựa vào các marker phân tử đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật.

Thế hệ lai ngược cuối cùng có thể được tự thụ phấn để tạo ra thế hệ con cháu chọn giống thuần chủng đối với (các) axit nucleic được chuyển. Các thực vật thu được thường là có về cơ bản là tất cả các đặc tính hình thái và sinh lý của các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến, ngoài (các) tính trạng được chuyển (ví dụ, một hoặc nhiều tính trạng đơn gen). Quy trình lai ngược chính xác sẽ phụ thuộc vào tính trạng được thay đổi để xác định quy trình thử nghiệm thích hợp. Mặc dù các phương pháp lai ngược được đơn giản hóa khi tính trạng được chuyển là alen trội, alen lặn cũng

có thể được chuyển. Trong trường hợp này, có thể cần để đưa ra một thử nghiệm với thế hệ con cháu để xác định tính trạng mong muốn có được chuyển thành công hay không.

Theo các phương án khác nhau, sáng chế tạo ra các thực vật đột biến, các thực vật không có trong tự nhiên hoặc thực vật chuyển gen, cũng như sinh khối trong đó mức độ biểu hiện của polynucleotit (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) được giảm xuống để giảm hàm lượng asparagin trong đó.

Các bộ phận của các thực vật này, cụ thể là các cây thuốc lá, và cụ thể hơn là phiến lá và gân lá của các cây thuốc lá, có thể được kết hợp vào hoặc được sử dụng trong việc tạo ra các sản phẩm tiêu thụ khác nhau bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các nguyên liệu tạo sol khí, các thiết bị tạo sol khí, các vật dụng hút thuốc, các vật dụng có khả năng tạo khói, các sản phẩm không khói, và các sản phẩm thuốc lá. Các ví dụ về các nguyên liệu tạo sol khí bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các chế phẩm thuốc lá, thuốc lá, dịch chiết từ cây thuốc lá, thuốc lá lợi, điếu lọc thuốc lá sợi, thuốc lá được xử lý hoặc làm khô, thuốc lá được mở rộng, thuốc lá đồng nhất, thuốc lá được hoàn nguyên, và tẩu thuốc lá. Các vật dụng hút thuốc và các vật có khả năng tạo khói là các loại thiết bị tạo ra sol khí. Các ví dụ về các vật dụng hút thuốc hoặc các vật có khả năng tạo khói bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở thuốc lá điếu, xì gà nhỏ, và xì gà. Các ví dụ về các sản phẩm không khói bao gồm thuốc lá nhai, và bột để hít. Trong các thiết bị tạo sol khí nhất định, ngoài việc đốt cháy (hoặc đốt), chế phẩm thuốc lá hoặc nguyên liệu tạo sol khí khác được làm nóng, ví dụ, bằng một hoặc nhiều bộ phận làm nóng điện tử hoặc nguồn nhiệt cacbon để tạo ra sol khí. Điển hình là, trong các vật dụng tạo sol khí được làm nóng như vậy, sol khí được tạo ra bởi sự truyền nhiệt từ nguồn nhiệt đến nền hoặc nguyên liệu tạo sol khí riêng biệt về mặt vật lý, mà có thể được đặt ở bên trong, ở xung quanh hoặc ở phía dòng ra của nguồn nhiệt. Trong khi hút thuốc, các hợp chất bay hơi được giải phóng từ nền tạo sol khí bởi sự truyền nhiệt từ nguồn nhiệt và được cuốn vào không khí được hút thông qua vật dụng hút thuốc. Khi các hợp chất được giải phóng nguội đi, chúng ngưng tụ tạo ra sol khí mà được hít bởi người sử dụng. Các thiết bị này bao gồm, ví dụ, các thiết bị tạo sol khí được làm nóng bằng điện trong đó sol khí được tạo ra do sự truyền nhiệt từ thiết bị tạo sol khí đến nền tạo sol khí của vật dụng tạo sol khí được làm nóng. Thích hợp là, trong suốt quá trình làm nóng nền tạo sol khí, việc đốt cháy hoặc đốt thuốc lá không xảy ra. Vật tạo sol khí thích hợp được mô tả trong WO2013/098405 và bao gồm nền tạo sol khí để tạo ra sol khí có thể hít được khi được

làm nóng bởi chi tiết làm nóng bên trong của thiết bị tạo sol khí. Nó có thể bao gồm thiết bị tạo sol khí điện tử bao gồm chi tiết làm nóng bên trong. Nó có thể còn bao gồm, theo kết cấu bố trí thẳng liên tiếp, nền tạo sol khí, chi tiết đỡ được bố trí ngay ở phía dòng sau nền tạo sol khí, chi tiết làm nguội sol khí được bố trí ở phía dòng ra của chi tiết đỡ, và vỏ bọc bên ngoài bao quanh nền tạo sol khí, chi tiết đỡ và chi tiết làm nguội sol khí. Chi tiết đỡ có thể nhô ra khỏi nền tạo sol khí. Nền tạo sol khí thấm qua được bởi chi tiết làm nóng của thiết bị tạo sol khí.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "đốt cháy" dùng để chỉ phản ứng hóa học oxy hóa khử mà các phân tử chất phản ứng, được gọi là nhiên liệu và chất oxy hóa, trộn và bố trí lại để trở thành các phân tử sản phẩm với sự giải phóng nhiệt đồng thời. Sự đốt cháy có thể được chỉ ra một cách tích cực bằng sự có mặt của lượng nitơ oxit có liên quan trong các sản phẩm khí, không được tạo ra từ sự phân hủy các nitrat có trong chất nền phản ứng ban đầu, và bằng chứng rõ ràng về quá trình tỏa nhiệt toàn bộ đồng thời. Sự phát triển của các lượng nitơ oxit liên quan trong các sản phẩm khí để đốt có thể được xác định bằng cách so sánh tổng lượng các nitơ oxit được hình thành trong các điều kiện quan tâm (ví dụ, trong không khí) và các oxit nitơ được hình thành trong cùng điều kiện nhưng trong trường hợp không có oxy (ví dụ, trong môi trường khí chỉ chứa nitơ hoặc heli). Theo loại khác của vật dụng tạo sol khí được làm nóng, sol khí được tạo ra bởi sự truyền nhiệt từ thành phần nhiên liệu dễ cháy hoặc nguồn nhiệt đến nguyên liệu tạo sol khí riêng biệt về mặt vật lý, mà có thể được đặt ở bên trong, ở xung quanh hoặc ở phía sau nguồn nhiệt. Các sản phẩm thuốc lá không khói và các nguyên liệu tạo sol khí chứa thuốc lá khác có thể chứa thuốc lá ở bất kỳ dạng nào, bao gồm như các hạt được sấy, mảnh vụn, hạt nhỏ, bột, hoặc chất pha trộn loãng, được lắng đọng, trộn lẫn, bao quanh, hoặc ngoài ra được kết hợp với các thành phần khác ở bất kỳ dạng nào, như mảnh, màng, miếng, bọt hoặc hạt. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ 'khói' được sử dụng để mô tả loại sol khí được tạo ra bởi các vật dụng hút thuốc, như các điếu thuốc lá dễ cháy, hoặc bằng cách đốt cháy nguyên liệu tạo sol khí.

Theo các phương án nhất định, làm nóng mà không đốt cháy hoặc đốt nguyên liệu thực vật được ưu tiên.

Theo một phương án, sáng chế còn tạo ra nguyên liệu thực vật được làm khô từ các cây thuốc lá đột biến, chuyển gen và không có trong tự nhiên được mô tả ở đây. Các quá trình làm khô lá của cây thuốc lá tươi được biết đến bởi người có hiểu biết trung

bình trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm mà không có giới hạn, làm khô bằng khí, làm khô bằng lửa, được làm khô bằng không khí nóng và làm khô nhờ mặt trời. Quy trình làm khô lá của cây thuốc lá tươi phụ thuộc vào loại thuốc lá được thu hoạch. Ví dụ, chủng Burley và các chủng sẫm màu nhất định thường lá được làm khô bằng không khí, và thuốc lá tẩu, thuốc lá nhai, và thuốc lá ngửi thường lá được làm khô bằng lửa.

Theo một phương án khác, sáng chế còn tạo ra nguyên liệu thực vật được sấy khô từ các cây thuốc lá đột biến, chuyển gen và không có trong tự nhiên được mô tả ở đây. Các quy trình làm khô lá được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm mà không giới hạn hong khô và phơi khô. Quy trình làm khô lá chính xác phụ thuộc vào loại thực vật được thu hoạch. Thích hợp là, nguyên liệu thực vật được làm khô sau khi thu hoạch. Do đó, việc sử dụng nguyên liệu được làm khô và nguyên liệu được làm khô sau khi thu hoạch được bao gồm ở đây. Quá trình làmkhô có thể kích hoạt một hoặc nhiều gen kèm theo sự lão hóa. Sự biểu hiện hoạt tính của các gen và các protein được mô tả ở đây có thể được giám sát trong quá trình xử lý hoặc làm khô. Cũng như vậy, nồng độ của asparagin, nicotin, glutamin, axit aspartic và axit glutamic có thể được giám sát trong quá trình xử lý hoặc làm khô. Bằng cách ví dụ, các phép đo có thể được thực hiện sau 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hoặc 100 giờ xử lý hoặc làm khô. Theo cách của ví dụ khác, các phép đo có thể được thực hiện sau 0 ngày, 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày hoặc 10 ngày hoặc nhiều hơn.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả các sản phẩm thuốc lá bao gồm các nguyên liệu tạo sol khí chứa thuốc lá bao gồm nguyên liệu thực vật – như lá, tốt hơn là lá được xử lý hoặc làm khô - từ các cây thuốc lá đột biến, các cây thuốc lá chuyển gen hoặc các cây thuốc lá không có trong tự nhiên được mô tả ở đây. Các sản phẩm thuốc lá được mô tả ở đây có thể là sản phẩm thuốc lá trộn mà còn có thể chứa thêm các cây thuốc lá không biến đổi.

Lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá được mô tả ở đây sau khi xử lý hoặc làm khô (ví dụ, 3 ngày của quá trình xử lý hoặc làm khô) là thấp hơn khoảng 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và 100% – như thấp hơn khoảng 200% hoặc 300% - so với thực vật đối chứng. Thích hợp là, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá được mô tả ở đây sau khi xử lý hoặc làm khô

(ví dụ, 3 ngày của quá trình xử lý hoặc làm khô) thấp hơn ít nhất là khoảng 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, và 100% – như thấp hơn khoảng 200% hoặc 300% - so với đối chứng, tốt hơn là, thấp hơn ít nhất là khoảng 80% hoặc thấp hơn ít nhất là khoảng 90% - so với đối chứng.

Lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá được mô tả ở đây sau khi xử lý hoặc làm khô (ví dụ, 3 ngày của quá trình xử lý hoặc làm khô) là khoảng 40mg/g trọng lượng khô của lá hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 35mg/g trọng lượng khô lá hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 30mg/g trọng lượng khô lá hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 25mg/g trọng lượng khô lá hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 20mg/g trọng lượng khô lá hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 15mg/g trọng lượng khô hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 12mg/g trọng lượng khô, tốt hơn là, khoảng 10mg/g trọng lượng khô trọng lượng khô lá hoặc ít hơn, tốt hơn là, khoảng 5mg/g trọng lượng khô lá hoặc ít hơn. Thích hợp là, lá được thu hoặc từ vị trí cuối-giữa thân của thực vật.

Lượng acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô và thu được bằng cách làm nóng thấp hơn ít nhất là khoảng 70% so với đối chứng. Bằng cách ví dụ, lượng acrylamit trong sol khí chuyển hóa từ sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô và thu được bằng cách làm nóng là khoảng 1,5µg trên mỗi điếu thuốc.

Lượng acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô và thu được bằng cách đốt thấp hơn ít nhất là khoảng 55% so với đối chứng. Bằng cách ví dụ, lượng acrylamit trong sol khí chuyển hóa từ sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô và thu được bằng cách đốt là khoảng 2,5µg trên mỗi điếu thuốc.

Thích hợp là, lượng acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc sấy khô và thu được bằng cách đốt hoặc làm nóng thấp hơn ít nhất là khoảng 55% đến khoảng 70% so với đối chứng. Bằng cách ví dụ, lượng acrylamit trong sol khí chuyển hóa từ sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô và thu được bằng cách đốt hoặc làm nóng là nằm trong khoảng từ khoảng 1,5µg trên mỗi điếu thuốc đến 2,5µg trên mỗi điếu thuốc.

Lượng nicotin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật, sản phẩm thuốc lá hoặc sol khí có thể về cơ bản là giống như lượng nicotin từ các thực vật, các bộ phận của thực vật, các nguyên liệu thực vật, các vật dụng có khả năng tạo khói, các sản phẩm không khói và các sol khí từ thực vật đối chứng. Ví dụ, lượng nicotin có thể là trong vòng khoảng 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% hoặc ít hơn lượng nicotin mà có trong thực vật đối chứng. Thích hợp là, lượng nicotin trong vòng khoảng 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% hoặc ít hơn lượng nicotin mà có trong thực vật đối chứng. Lượng nicotin thường là nằm trong khoảng từ 15 đến 20mg/g trọng lượng khô sinh khối của lá.

Theo một phương án, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi làm khô (ví dụ, lá rụng được làm khô) thấp hơn ít nhất là khoảng 20% (ví dụ, thấp hơn ít nhất là khoảng 22%) và lượng acrylamit trong sol khí chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý (ví dụ, lá rụng được xử lý) thấp hơn ít nhất là khoảng 25% (ví dụ, thấp hơn ít nhất là khoảng 24%) so với đối chứng. Theo một phương án khác, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý (ví dụ, lá rụng được xử lý) là khoảng 12mg/g trọng lượng khô hoặc ít hơn và lượng acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý (ví dụ, lá rụng được xử lý) là khoảng 2,5µg/điếu thuốc hoặc ít hơn. Thích hợp là, nồng độ nicotin về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong đối chứng.

Theo một phương án khác, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý (ví dụ, lá rụng được xử lý) thấp hơn ít nhất là khoảng 70% (ví dụ, thấp hơn ít nhất là khoảng 66%) và lượng acrylamit trong sol khí chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý thấp hơn ít nhất là khoảng 45% (ví dụ, thấp hơn ít nhất là khoảng 44%) so với đối chứng. Theo một phương án khác, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi làm khô (ví dụ, lá rụng được xử lý) là khoảng 12mg/g trọng lượng khô hoặc ít hơn và lượng acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật

hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi làm khô là khoảng 3µg/điếu thuốc hoặc ít hơn. Thích hợp là, nồng độ nicotin về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong đối chứng.

Theo một phương án khác, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý (ví dụ, lá rụng được xử lý) thấp hơn ít nhất là khoảng 90% (ví dụ, ít nhất là khoảng 88% hoặc thấp hơn) và lượng acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý thấp hơn ít nhất là khoảng 70% so với đối chứng. Theo một phương án khác, lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý (ví dụ, lá rụng được xử lý) là khoảng 5mg/g trọng lượng khô hoặc ít hơn và lượng acrylamit trong sol khí chuyển hóa từ thực vật này, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý là khoảng 1,5µg/điếu thuốc hoặc ít hơn. Thích hợp là, nồng độ nicotin về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong đối chứng.

Theo một phương án khác, điều biến sự biểu hiện của *NtASN1* qua ARNi có thể: (i) giảm lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô (ví dụ, lá rụng được xử lý) xuống từ 24% đến khoảng 89% (ví dụ, xuống khoảng 35mg/g đến khoảng 5mg/g); (ii) giữ nguyên nồng độ nicotin ở khoảng 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% hoặc ít hơn lượng nicotin mà có trong thực vật đối chứng (ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 15 đến 20mg/g trọng lượng khô sinh khối của lá); và (iii) giảm nồng độ acrylamit trong sol khí xuống ít nhất là khoảng 70% đến khoảng 1,5 3µg/điếu thuốc hoặc ít hơn. Lượng sinh khối lá thường là nằm trong khoảng 300-400g.

Theo một phương án khác, điều biến sự biểu hiện của *NtASN5* qua ARNi có thể: (i) giảm lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô (ví dụ, lá rụng được xử lý) xuống từ khoảng 35% đến khoảng 66% (ví dụ, xuống khoảng 31mg/g đến khoảng 18mg/g); (ii) giữ nguyên nồng độ nicotin ở khoảng 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% hoặc 1% hoặc ít hơn lượng nicotin mà có trong thực vật đối chứng (ví dụ, nằm trong khoảng từ khoảng 15 đến 20mg/g trọng lượng khô sinh khối của lá); và (iii) giảm nồng độ acrylamit trong sol khí xuống ít nhất là khoảng 44% đến khoảng 3 µg/điếu thuốc hoặc ít hơn. Lượng sinh khối lá thường là nằm trong khoảng 300-400g.

Theo một phương án khác, điều biến sự biểu hiện của *NtASN1* qua tạo đột biến có thể: (i) giảm lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô (ví dụ, lá rụng được xử lý) xuống từ khoảng 17% đến khoảng 83% (ví dụ, xuống khoảng 19,4mg/g đến khoảng 4,7mg/g); và (iii) giảm nồng độ acrylamit trong sol khí xuống ít nhất là khoảng 24% đến khoảng 2,5µg/điếu thuốc hoặc ít hơn.

Theo một phương án khác, điều biến sự biểu hiện của *NtASN5* qua việc tạo đột biến có thể giảm lượng asparagin trong thực vật, phần của thực vật, nguyên liệu thực vật, sản phẩm thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá sau khi xử lý hoặc làm khô (ví dụ, lá rụng được xử lý) xuống từ khoảng 44% (ví dụ, đến khoảng 14,5mg/g). Các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến có thể có các ứng dụng khác, ví dụ, trong nông nghiệp. Ví dụ, các thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến được mô tả ở đây có thể được sử dụng để tạo ra các sản phẩm thức ăn cho động vật và thức ăn cho người.

Sáng chế còn đề xuất các phương pháp để tạo ra hạt bao gồm nuôi trồng thực vật đột biến, thực vật không có trong tự nhiên, hoặc thực vật chuyển gen được mô tả ở đây, và thu hạt từ các thực vật được nuôi trồng. Các hạt từ các thực vật được mô tả ở đây có thể được điều hòa và được đóng túi trong nguyên liệu đóng gói theo các cánh đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật để tạo ra vật phẩm cho sản xuất. Nguyên liệu đóng gói như giấy và vải được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Gói hạt có thể có nhãn, ví dụ, thẻ hoặc nhãn được gắn với nguyên liệu đóng gói, nhãn được in lên bao gói mà mô tả bản chất của hạt trong đó.

Các chế phẩm, các phương pháp và các bộ kit để xác định tính chất di truyền của thực vật để xác nhận, chọn lọc, hoặc chọn giống có thể bao gồm các phương thức phát hiện sự có mặt polynucleotit (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) trong mẫu polynucleotit. Theo đó, chế phẩm được mô tả bao gồm một hoặc nhiều đoạn mồi để khuếch đại đặc hiệu ít nhất là một phần của một hoặc nhiều polynucleotit và tùy ý là một hoặc nhiều đoạn dò và tùy ý là một hoặc nhiều chất thử để thực hiện khuếch đại hoặc phát hiện.

Theo đó, đoạn mồi hoặc đoạn dò oligonucleotit đặc hiệu gen bao gồm khoảng 10 hoặc nhiều polynucleotit liền kề tương ứng với (các) polynucleotit được mô tả ở đây được bộc lộ. Đoạn mồi hoặc đoạn dò đã nêu có thể gồm hoặc bao gồm khoảng 15, 20,

25, 30, 40, 45 hoặc 50 polynucleotit liền kề nữa mà lai (ví dụ, lai đặc hiệu) với (các) polynucleotit được mô tả ở đây. Theo một số phương án, đoạn mồi hoặc đoạn dò có thể gồm hoặc bao gồm khoảng 10 đến 50 nucleotit liền kề, khoảng 10 đến 40 nucleotit liền kề, khoảng 10 đến 30 nucleotit liền kề hoặc khoảng 15 đến 30 nucleotit liền kề mà có thể được sử dụng trong các phương pháp xác định gen phụ thuộc trình tự (ví dụ, lai Southern) hoặc phân lập (ví dụ, lai tại chỗ (*in situ*) các khuẩn lạc hoặc các mảng thực khuẩn thể) hoặc phát hiện gen (ví dụ, như một hoặc nhiều đoạn mồi khuếch đại trong khuếch đại hoặc phát hiện axit nucleic). Một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc đoạn dò đặc hiệu có thể được thiết kế và được sử dụng để khuếch đại hoặc phát hiện một phần hoặc tất cả (các) polynucleotit. Theo cách của ví dụ cụ thể, hai đoạn mồi có thể được sử dụng trong quy trình phản ứng chuỗi polymeraza để khuếch đại mảnh axit nucleic mã hóa axit nucleic – như ADN hoặc ARN. Phản ứng chuỗi polymeraza còn có thể được thực hiện mà sử dụng một đoạn mồi mà chuyển hóa từ trình tự axit nucleic và đoạn mồi thứ hai mà lai với trình tự nằm phía trước hoặc nằm phía sau trình tự axit nucleic – như trình tự promotơ, đầu 3' của tiền phân tử mARN hoặc trình tự chuyển hóa từ vectơ. Các ví dụ về các kỹ thuật nhiệt và đẳng nhiệt hữu ích để khuếch đại *in vitro* các polynucleotit được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Mẫu có thể là hoặc có thể có nguồn gốc từ thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật hoặc sản phẩm thuốc lá được tạo ra hoặc có nguồn gốc từ thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp phát hiện (các) polynucleotit được mô tả ở đây (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây) trong mẫu bao gồm các bước: (a) chuẩn bị mẫu bao gồm, hoặc nghi ngờ là bao gồm, polynucleotit; (b) cho mẫu đã nêu tiếp xúc với một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc một hoặc nhiều đoạn dò để phát hiện đặc hiệu ít nhất là một phần củ (các) polynucleotit; và (c) phát hiện sự có mặt của sản phẩm khuếch đại, trong đó sự có mặt của sản phẩm khuếch đại là dấu hiệu cho sự có mặt của (các) polynucleotit trong mẫu này. Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất việc sử dụng một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc đoạn dò để phát hiện đặc hiệu ít nhất là một phần của (các) polynucleotit. Các bộ kit phát hiện ít nhất là một phần của (các) polynucleotit cũng được tạo ra mà bao gồm một hoặc nhiều đoạn mồi hoặc đoạn dò để phát hiện đặc hiệu ít nhất là một phần của (các) polynucleotit. Bộ kit có thể bao gồm các chất phản ứng cho sự khuếch đại polynucleotit - như PCR - hoặc các chất phản ứng cho kỹ thuật phát hiện sử dụng lai đoạn dò như lai Southern Blot, lai

Northern Blot, lai tại chỗ, hoặc vi dãy. Bộ kit có thể bao gồm các chất phản ứng cho kỹ thuật phát hiện sử dụng sự liên kết kháng thể như lai Western Blot, ELISA, phối phổ SELDI hoặc dải kiểm tra. Bộ kit có thể bao gồm các chất phản ứng cho giải trình tự ADN. Bộ kit có thể bao gồm các chất phản ứng và các chỉ dẫn để xác định ít nhất là hàm lượng asparagin và/hoặc hàm lượng sol khí acrylamit trong nguyên liệu thực vật, nguyên liệu thực vật được làm khô hoặc sấy khô hoặc lá được xử lý hoặc làm khô.

Theo một số phương án, bộ kit có thể bao gồm các chỉ dẫn cho một hoặc nhiều phương pháp được mô tả. Các bộ kit được mô tả có thể là hữu ích để xác định độ tương đồng di truyền, các nghiên cứu phát sinh loài, xác định tính chất di truyền, xác định nhóm đơn bội, phân tích phả hệ hoặc chọn giống thực vật cụ thể là với ghi điểm đồng trội.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định tính chất di truyền của thực vật, tế bào thực vật hoặc nguyên liệu thực vật chứa polynucleotit như được mô tả ở đây. Xác định tính chất di truyền tạo ra cách thức phân biệt các phân tử đồng đẳng của cặp nhiễm sắc thể và có thể được sử dụng để biệt hóa các thể cô lập trong quần thể thực vật. Các phương pháp marker phân tử có thể được sử dụng với các nghiên cứu phát sinh loài, đặc điểm hóa mối quan hệ di truyền giữa các giống cây trồng, xác định các phép lai hoặc lai soma, định vị các mảnh nhiễm sắc thể mà ảnh hưởng đến các tính trạng đơn gen, tách dòng dựa trên bản đồ, và nghiên cứu về kế thừa định lượng. Phương pháp đặc hiệu để xác định tính chất di truyền có thể sử dụng số lượng bất kỳ các phương pháp phân tích marker phân tử bao gồm các đa hình chiều dài mảnh khuếch đại (AFLPs: amplification fragment length polymorphisms). Các AFLP là sản phẩm của các khác biệt alen giữa các mảnh khuếch đại do độ biến thiên trình tự nucleotit. Do đó, sáng chế còn đề cập đến cách thức để theo sự cô lập một hoặc nhiều gen hoặc axit nucleic cũng như các trình tự nhiễm sắc thể được nối di truyền với các gen hoặc axit nucleic này mà sử dụng các kỹ thuật như là phân tích AFLP.

Theo một phương án, sáng chế còn tạo ra nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc được làm khô từ các thực vật đột biến, chuyển gen và không có trong tự nhiên được mô tả ở đây. Ví dụ, các quá trình xử lý hoặc làm khô lá của cây thuốc lá được biết đến bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm mà không có giới hạn, xử lý trong không khí, xử lý bằng lửa, được xử lý bằng không khí nóng và xử lý dưới nắng. Quy

trình xử lý lá của cây thuốc lá tươi phụ thuộc vào loại thuốc lá được thu hoạch như được mô tả ở trên.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả các sản phẩm thuốc lá bao gồm các sản phẩm thuốc lá bao gồm nguyên liệu thực vật – như lá, thích hợp là, nguyên liệu thực vật đã được làm khô – như lá được xử lý hoặc làm khô - từ các thực vật đột biến, chuyển gen và không có trong tự nhiên được mô tả ở đây hoặc được tạo ra bởi các phương pháp được mô tả ở đây. Các sản phẩm thuốc lá được mô tả ở đây còn có thể chứa thêm các cây thuốc lá không biến đổi.

Theo một phương án khác, sáng chế mô tả các sản phẩm thuốc lá bao gồm nguyên liệu thực vật, tốt hơn là lá - như là lá được xử lý hoặc làm khô, từ các thực vật đột biến, chuyển gen và không có trong tự nhiên được mô tả ở đây. Ví dụ, nguyên liệu thực vật có thể được thêm vào bên trong hoặc bên ngoài sản phẩm thuốc lá và do đó, sau khi mùi hương mong muốn được thoát ra. Sản phẩm thuốc lá theo phương án này có thể thậm chí là thuốc lá không biến đổi hoặc thuốc lá được biến đổi. Sản phẩm thuốc lá theo phương án này có thể thậm chí có nguồn gốc từ thực vật đột biến, chuyển gen hoặc không có trong tự nhiên mà có các biến đổi trong một hoặc nhiều gen ngoài các gen được bộc lộ ở đây.

Sáng chế còn được mô tả trong các ví dụ dưới đây, mà được đưa ra để mô tả sáng chế chi tiết hơn. Những ví dụ này, đưa ra chế độ được ưu tiên hiện đang được xem xét để thực hiện sáng chế, nhằm minh họa và không hạn chế sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 - Tổng hợp asparagin trong lá của cây thuốc lá được làm khô

Trong quá trình xử lý lá của cây thuốc lá và đặc biệt là lá của giống cây trồng Burley, asparagin chủ động được tạo ra đóng góp đến khoảng 50% trên tổng số các axit amin có trong lá được xử lý. Trên Fig. 1, sự gia tăng asparagin và axit amin tự do tổng số được thể hiện, chủ yếu là thu được từ sự gia tăng asparagin, trong lá được xử lý của ba giống cây trồng thuốc lá Burley được sinh trưởng và xử lý trong không khí song song trên cùng một cánh đồng và kho. Ngạc nhiên là, asparagin là axit amin duy nhất được tích lũy đáng kể trong quá trình xử lý. Xét rằng asparagin được tổng hợp trong suốt pha sớm của quá trình xử lý, sau đó phản ứng này phụ thuộc vào các hoạt tính của asparagin synthetaza mà sử dụng glutamin và aspartat làm cơ chất. Tuy nhiên, trên Fig. 1, Asp và

Gln chỉ thể hiện sự gia tăng nhỏ so với asparagin, do đó gợi ý rằng lượng tập hợp của Gln và Asp dường như là thay đổi trong suốt quá trình xử lý trong không khí kéo dài (>2 tháng). Không có sự biến đổi nào trong lượng tập hợp của glutamat được quan sát thấy (dữ liệu không được thể hiện).

Fig. 2 chỉ ra rằng Gln tăng trong 4 ngày đầu tiên của quá trình xử lý (96 giờ) và sau đó, giảm ở thời điểm bắt đầu quá trình tích lũy asparagin. Ngược lại, lượng tập hợp aspartat vẫn gần như là phẳng, mặc dù một số dao động có thể quan sát được. Không mong muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết cụ thể nào, lượng tập hợp của glutamin có thể có vai trò làm cơ chất cho (các) asparagin synthetaza để tạo ra asparagin trong 4-5 ngày đầu tiên của quá trình xử lý (xem Fig.3).

Như đã nêu trên, sự tích lũy asparagin được quan sát thấy trong quá trình xử lý có thể là kết quả từ hoạt tính đặc hiệu của asparagin synthetaza được cảm ứng bởi sự già hóa. Một khi được làm nóng hoặc được đốt cháy, asparagin và các đường khử có tiềm năng để tạo ra acrylamit trong sol khí qua phản ứng Maillard. Có mối tương quan tốt tồn tại giữa asparagin được tích lũy trong lá của cây thuốc lá được xử lý hoặc hỗn hợp thuốc lá trộn và acrylamit được đo trong sol khí (xem Fig. 4). Không mong muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ học thuyết cụ thể nào, điều này gợi ý rằng sự gia tăng acrylamit trong sol khí phụ thuộc hoàn toàn vào sự có mặt của asparagin. Ngoài ra, sự có mặt của asparagin trong các mô lá cũng có liên quan đến quá trình xử lý được sử dụng, như được chỉ ra trên Fig.5.

Ví dụ 2 - các gen asparagin synthetaza trong thuốc lá

6 gen asparagin synthetaza có chiều dài đủ được nhận diện trong thuốc lá và được gọi là *NtASN1-S*, *NtASN1-T*, *NtASN3-S*, *NtASN3-T*, *NtASN5-S* và *NtASN5-T*. Thú vị là, Arabidopsis có 3 gen có liên quan đến asparagin synthetaza *AtASN1*, *AtASN2* và *AtASN3* và cà chua chỉ có 2 gen có chiều dài đủ (*Solyc06g007180* và *Solyc04g055200*). Các phân tích phát sinh loại mà sử dụng các trình tự protein giả định chuyển hóa từ các trình tự hệ gen được trích xuất từ hệ gen của cây thuốc lá (Sierro et al., 2014) gợi ý rằng trong quá trình tiến hóa, hai nhóm asparagin synthetaza đã phân tách ra (xem Fig.6). Thực vậy, một nhóm bao gồm Solyc04g055200, AtASN2 & 3 gần với NtASN3-S và NtASN3-T. Sản phẩm gen của AtASN2 thuộc nhóm này được định vị trong phloem và rõ ràng là cần thiết để đồng hóa nitơ, phân bố và tái lưu thông trong các mô tươi (Gaufichon et al.,

2013 Plant Cell Environ. Feb;36(2):328-42.). Nhóm này thuộc phân lớp Hai lá mầm của lớp II. Nhóm thứ hai bao gồm Solyc06g007180, AtASN1, NtASN1-S, NtASN1-T, NtASN5-S và NtASN5-T thuộc phân lớp Hai lá mầm của lớp I (Gaufichon *et al.,* 2010 Ann Bot. 2010 Jun;105(7):1141-57.). Sự biểu hiện quá mức của AtASN1 góp phần làm tăng hàm lượng asparagin trong hoa và sự phát triển quả cải và vào sự gia tăng hàm lượng protein trong hạt, nhờ đó, xác nhận sự vận chuyển gia tăng asparagin từ mô nguồn đến mô tiêu thụ. Điều này gợi ý rằng nhóm AtASN1 được dành nhiều hơn cho sự chuyển vị nguồn ni ơ đến hạt để cho phép sự nảy mầm hạt chính xác và khả năng dung nạp cao của các cây con đối với các cơ chất giới hạn nitơ (Lam *et al.*, 2003 Plant Physiol. 2003 Jun;132(2):926-35).

Phần trăm tương đồng giữa các sản phẩm gen cho thấy rằng NtASN3-S và NtASN3-T là giống nhau, và rất gần với Solyc04g055200 và AtASN3 (độ tương đồng 85%) gợi ý rằng cụm gen này được bảo toàn tương đối tốt trong quá trình tiến hóa, dường như là giữ nguyên sự đồng hóa nitơ trong các mô sinh dưỡng (xem ở trên). Thú vị là, mỗi bản sao protein được cảm ứng bởi *N. sylvestris* và *N. tomemtosiformis* của *NtASN1-S*/*NtASN1-T*, và *NtASN5-S*/*NtASN5-T* đều có phần trăm tương đồng là gần 98%. Điều này gợi ý rằng chức năng gen của cả hai bản sao *ASN1* và *ASN5* dường như được bảo toàn giữa mỗi cây thuốc lá tổ tiên và dường như là được biến đổi từ một tổ tiên chung duy nhất như được phát hiện trong cà chua và Arabidopsis. Ngoài ra, NtASN5-S có độ tương đồng là 95% với Solyc06g007180 thể hiện chức năng tương tự.

Biết rằng asparagin tăng nhanh chóng trong suốt quá trình xử lý trong không khí thuốc lá Burley, sự tạo ra asparagin trong pha sớm của quá trình xử lý (xem Fig. 1 và Fig. 2) có thể không là kết quả trực tiếp từ sự phân hủy phân giải protein của các protein hoặc polypeptit mà là từ sự tổng hợp *denovo* trong quá trình xử lý. Nếu như vậy, và như đã đề cập ở trên, sự tổng hợp asparagin có thể chỉ chuyển hóa từ (các) asparagin synthetaza có hoạt tính.

Để xác định sự biểu hiện của các gen asparagin synthetaza trong quá trình xử lý, dữ liệu thu được từ các phân tích vi mảng sử dụng các chip gen Tobarray Affymetrix (Martin *et al. BMC Genomics* 2012, 13:674) được phân tích. Các ARN lá được phân lập theo phương thức thời gian- quá trình trong 96 giờ xử lý đầu tiên. Các đoạn dò đặc hiệu (độ tương đồng là 100%) khớp với sáu trình tự mã hóa *ASN* (NtPMIa1g47375e1_st đối với *ASN1-T*; NtPMIa1g31395e1_st đối với *ASN1-S*; NtPMIa1g25255e1_st đối với

ASN5-T; NtPMIa1g57337e1_st đối với *ASN5-S*; NtPMIa1g152348e1_st đối với *ASN3-T* và NtPMIa1g121582e1_st đối với *ASN3-S*) được xác định. Để chuẩn bị ARN, lá được thu ở vị trí giữa thân của loại Stella (CH-Burley)một cách trực tiếp trên cánh đồng (-4 giờ), thời điểm 0 là thời điểm mà lá được treo trong kho xử lý trong không khí. *ASN3-S* và *ASN3-T* chỉ được biểu kém trong lá Burley trong quá trình xử lý trong không khí. Ngược lại, *ASN1-S*, *ASN1-T* và *ASN5-S* được biểu hiện ở mức độ cao ở lúc bắt đầu quá trình xử lý (già hóa, pha vàng hóa), trong khi *ASN5-T* được điều hòa tăng chỉ sau khi thu hoạch và sau đó giảm liên tục trong 96 giờ đầu tiên của quá trình xử lý (Fig. 7).

Để kiểm tra sự lai chéo bất kỳ có thể xảy ra trong các phân tích vi mảng, cụ thể là đối với các gen có độ tương đồng trình tự cao, sự biểu hiện của *ASN1-S/T* và *ASN5-S/T* mà sử dụng công nghệ ARNseq, được phân tích. Dữ liệu được biểu diễn trên Fig. 8. Trong Swiss Burley "Stella" (Fig. 8A), dữ liệu ARNA-seq xác nhận rằng *ASN5-T* được cảm ứng trong quá trình xử lý ít hơn ba bản sao *ASN1/5* khác (xem Fig. 7), *ASN1-T* là gen được biểu hiện mạnh mẽ nhất sau hai ngày xử lý trong không khí đầu tiên. Hoạt động của gen *ASN* này không xuất hiện với cường độ tương tự trong Swiss bright Virginia "ITB 683" làm khô theo cách cổ điển trong lò. Trong loại thuốc lá này, sự biểu hiện của *ASN1-S/T* và *ASN5-S/T* vẫn thấp sau khi xử lý 48 giờ. Trong cả hai loại thuốc lá, sự biểu hiện của *ASN3S/T* không được cảm ứng bởi quá trình xử lý (Fig. 8C&D), do đó, việc xác nhận dữ liệu Affymetrix được trình bày trên Fig. 7.

Để kiểm tra độ mạnh mẽ của sự cảm ứng gen *ASN* trong pha sớm của quá trình xử lý lá Burley, ARN được phân lập trước và sau 60 giờ xử lý trong kho từ bốn mẫu Burley đăng ký (BU1-4: Saplack, BanketA1, Stella và TN90), được trồng đồng thời trên cánh đồng tại Thụy Sĩ (2013). Thời điểm để phân lập ARN được kéo dài đến 60 giờ, do TN90 cần nhiều thời gian hơn để bắt đầu sự vàng lá tại Thụy Sĩ. Sự biểu hiện dữ liệu (Fig. 9A) này thể hiện rằng trong tất cả các lá Burley, *ASN1-T* và *ASN5-T* một lần nữa là các gen *ASN* được biểu hiện nhiều nhất và ít nhất trong quá trình xử lý trong không khí (ngoại trừ *ASN1-T* trong BU2), tương ứng, nhờ đó, xác nhận dữ liệu được đưa ra trên Fig. 8. Các sản phẩm phiên mã *ASN1-S* và *ASN5-S* được biểu hiện ổn định và liên tục trong pha sớm của quá trình xử lý lá của mẫu Burley đăng ký khác. Fig. 9B xác nhận rằng hai bản sao *ASN3* chuyển hóa từ *N. tomentosiformis* và *N. sylvestris* đều không được cảm ứng trong quá trình xử lý, do đó, gián tiếp xác nhận rằng hai bản sao này, gần

hơn với *AtASN2* (xem Fig. 6), dường như là có chức năng cơ bản hơn trong các mô thực vật sinh dưỡng để duy trì được lượng tổng hợp asparagin sinh lý.

Các phân tích về các sản phẩm phiên mã tương ứng trong 8 mô được thu từ các thực vật TN90 ở giai đoạn ra hoa và được trồng trên cánh đồng gợi ý rằng *ASN5-T* có hoạt tính trong hoa lớn hơn trong lá, các bản sao ARN *ASN5-T* cụ thể là được phát hiện thấy trong hoa, cánh hoa, đài hoa chưa trưởng thành (xem Fig. 10, bảng bên trái). Ngoài được biểu hiện trong lá, *ASN1-T* và *ASN1-S* còn được biểu hiện mạnh trong cánh hoa có khả năng đồng hóa nitrat mà là một chức năng mà đã được mô tả trong Arabidopsis (Lam et al., 2003 Plant Physiol. 2003 Jun;132(2):926-35) đối với gen trực giao *AtASN1* (xem Fig. 6). *ASN3-S/T* có sự biểu hiện cơ bản thấp trong tất cả 8 mô này (xem Fig. 10, bảng bên phải).

Ví dụ 3 - Các dòng ARNi TN90e3 *ASN1* và *ASN5*

Việc làm im lặng các bản sao *ASN1-S/ASN1-T* và *ASN5-S/ASN5-T* trong các cây thuốc lá Burley được nghiên cứu để xác định liệu nó có góp phần làm giảm asparagin trong lá Burley được xử lý. Các mảnh ADN đặc hiệu được tách dòng giữa promotơ MMV (virut khảm cây hoa phấn) cơ định mạnh hoặc promotơ già hóa E4 (asparagin synthetaza). Mảnh gen *ASN* được kẹp giữa bởi MMV hoặc E4 và trình tự kết thúc nos 3' của gen nopalin synthaza của *Agrobacterium tumefaciens* (Cheng *et al.*, 2003 In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39 595 604). Sơ đồ của các cấu trúc được sử dụng trong nghiên cứu này được thể hiện trên Fig.22. Dòng thuốc lá Burley TN90e4e5e10 (Zyvert) được biến nạp đơn lẻ với mỗi trong số năm cấu trúc mà sử dụng các quy trình biến nạp nhờ Agrobacterium tiêu chuẩn. TN90e4e5e10 (Zyvert) là một sự lựa chọn từ quần thể burley được tạo đột biến bằng etylmetan sulfonat (EMS) mà chứa các đột biến bất hoạt trong CYP82E4, CYP82E5v2 và CYP82E10, các gen asparagin synthetaza chính của thuốc lá (Lewis et al., 2010), để ngăn cản sự tạo ra nornicotin. Việc sử dụng một dòng nền có thể tránh các rắc rối tiềm tàng khi diễn giải dữ liệu TSNA trong tương lai.

Để có thể chọn lọc các thực vật mà có thể biểu hiện các gen chuyển tương ứng ở mức cao, ít nhất là 10 thực vật T0 độc lập cho mỗi cấu trúc được thử nghiệm bằng qPCR. Các hạt được thu hoạch từ ba dòng T0 của mỗi cấu trúc mà trình diện mức độ cao nhất của các sự kiện làm im lặng *ASN*. Để kiểm tra liệu thực vật con cháu T1mà được kế thừa

(các) mảnh gen ARNi có thực hiện hiệu quả việc làm im lặng gen, ARN được tách chiết từ 4 thực vật của các sự kiện biến nạp độc lập được chọn để thu được các hạt T2 phục vụ cho thử nghiệm thực địa trong tương lai (2016). Các dòng đối chứng TN90e4e5e10 (Zyvert)được sử dụng làm nền để so sánh hiệu suất của quá trình biến nạp.

Ba sự kiện biến nạp độc lập được chọn trong các thực vật ASN1-ARNi và ASN5-ARNi thế hệ T0 dựa vào nồng độ của các sản phẩm phiên mã *ASN1* và *ASN5*. Các thực vật ASN1-ARNi được tạo ra để làm im lặng cả hai bản sao *ASN1-T* và *ASN1-S* dưới sự điều khiển của promotơ MMV hoặc promotơ E4 và các thực vật ASN5-ARNi được tạo ra để làm im lặng cả hai bản sao *ASN5-T* và *ASN5-S* dưới sự điều khiển của promotơ MMV hoặc promotơ E4. Mười lăm thực vật được chọn lọc trên kanamyxin cho mỗi sự kiện biến nạp và được trồng trong nhà kính. Khi trưởng thành, bốn lá ở vị trí giữa-dưới thân được thu từ mỗi thực vật và được xử lý trong không khí trong 7 tuần.

Nồng độ của các axit amin và nicotin được xác định bằng HPLC-MS: Các phần phân ước (~30mg) của cây thuốc lá được nghiền được tách chiết bằng etanol-nước (1:1; 6mL) trong 45 phút ở 50°C. Các sản phẩm chiết ly tâm được pha loãng theo bậc 10. Sự phân tách sắc ký lỏng được thực hiện trên cột amit (Waters Acquity BEH amit, 2,1 x 150mm, 1,7µm) ở 45°C rửa giải bằng grandien là amoni format 2mM trong nước + axit formic 0,25% (dung dịch rửa giải A) và axetonitril + axit formic 0,1% (dung dịch rửa giải B), sử dụng gradien của dung dịch rửa giải (0 phút – 10% A, 0,5 phút – 10% A, 4 phút – 60% A, 4,5 phút – 60% A, 4,6 phút – 10% A, 6,8 phút – 10% A; tốc độ dòng 0,5 ml/phút). Để phản hiện quang phổ khối lượng của các axit amin thiết bị Q Exactive (Thermo Scientific) được sử dụng ở chế độ phun điện dương yêu cầu quang phổ quét toàn bộ. Nồng độ nicotin trong sản phẩm chiết được tính toán từ diện tích đỉnh của nó trong vạch 260nm của máy phát hiện UV/VIS đi ôt quang.

Asparagin được đo trong phiến lá được xử lý. Sau 3 ngày của quá trình xử lýtrong pha vàng hóa, một phần được dập lỗ của phiến lá được tách ra, ARN được phân lập từ mỗi thực vật và qPCR được thực hiện. Trên Fig. 11A, được chứng minh là mảnh gen ARNi *ASN1* dưới sự điều khiển của cai hai promotơ MMV và E4 ảnh hưởng đến nồng độ asparagin trong các mẫu lá được xử lý, lượng asparagin thay đổi trong các sự kiện biến nạp khác nhau. E284-4 đã thể hiện sự giảm asparagin là 24%, trong khi E284-6 thể hiện sự giảm asparagin là 89% so với các thực vật nền TN90e4e5e10 (Zyvert) được trồng song song. Hàm lượng asparagin có tương quan với nồng độ ARN *ASN1* sau 3

ngày của quá trình xử lý đối với cả hai promotơ MMV hoặc E4 (Fig. 11B), xác nhận rằng asparagin được tổng hợp trong quá trình xử lý và rằng các bản sao *ASN1-T* và/hoặc *ASN1-S* có liên quan đến sự tạo ra asparagin trong pha sớm của quá trình xử lý. Promotơ cơ định, giống như MMV, và promotơ già hóa, giống như E4, đều có hoạt tính làm im lặng *ASN1*. Hiệu suất của promotơ E4 xác thực rằng các gen *ASN1* có hoạt tính trong quá trình già hóa (vàng hóa) góp phần vào sự tạo ra asparagin trong quá trình xử lý lá, dường như là tái phân bố nitơ từ các lá nguồn đến các hạt. Sau ba ngày của quá trình xử lý, song song với các phân tích về phiên mã, asparagin cũng được đo, cũng thể hiện biên dạng giảm asparagin tương tự đối với 6 dòng được thử nghiệm, mặc dù chỉ khoảng một phần ba số axit aminđược tổng hợp sau quá trình (16,4mg/g trong đối chứng TN90e4e5e10 (Zyvert), dữ liệu không được hiển thị), đỉnh này của asparagin là tối đa sau 9-10 ngày của quá trình xử lý trong không khí sau khi thu hoạch lá (xem Fig. 2).

Asparagin synthetaza đang chuyển nhóm amin từ glutamin (Gln), axit amin thứ nhất cố định amoniac làm dạng nitơ được đồng hóa từ các nguồn dự trữ nitrat trong lá, thành aspartat (Asp). Từ hoạt động sử dụng ATP này, nó dẫn đến sự tạo ra asparagin (asparagin) và glutamat (Glu, cũng xem Fig. 3). Hệ quả là, chúng ta có thể suy ra rằng việc làm im lặng *ASN1* sẽ dẫn đến sự gia tăng Gln và Asp và giảm Glu.

Vì thế, trong cùng một mẫu, lượng Gln, Asp, Glu và nicotin cũng được phân tích. Sự gia tăng Gln đi kèm trong các mẫu này thể hiện sự giảm asparagin mạnh được quan sát thấy *tức là,* E281-6 và E282-1 và ngược lại, lượng Gln thấp hơn trong các mẫu này thể hiện asparagin thấp *tức là* E282-7 (Fig. 12A). Đối với cả Gln và asparagin, sự cân bằng axit amin thu được từ việc làm im lặng các gen *ASN1* được biến đổi theo cách ngược lại bên trong các lá được xử lý. Tác động tương tự cũng được quan sát thấy đối với Asp và Glu, nhưng ít đáng kể hơn so với Gln. Asp và Glu đều cho thấy sự gia tăng (~1,5-3x) trong tất cả các dòng được biến nạp thể hiện biên dạng Gln tương tự (ngoại trừ đối với Asp trong E282-7). Nhìn vào hoạt tính của asparagin synthetaza (xem Fig. 3), sư gia tăng Glu không được mong đợi.

Hàm lượng nicotin không bị ảnh hưởng bởi sự làm im lặng *ASN1*, không làm im lặng trong các cấu trúc MMV hoặc trong các cấu trúc E4, xác nhận rằng hoạt tính của *ASN1-S* và/hoặc *ASN1-T* không liên quan đến quá trình tổng hợp nicotin và bị giới hạn với sự trưởng thành lá sau khi thu hoạch trong quá trình già hóa sớm.

Thí nghiệm tương tự được thực hiện để làm im lặng *ASN5-S* và *ASN5-T* sử dụng các dòng chuyển gen ARNi. Dữ liệu này thể hiện rằng asparagin được giảm hiệu quả, đặc biệt là trong hai dòng khi mảnh ARNi *ASN5* được biểu hiện dưới sự điều khiển của promotơ cơ định MMV, và không hoặc chỉ dưới sự điều khiển ở mức độ nhẹ của promotơ E4 (Fig. 13A). Thú vị là, dữ liệu này chỉ tương quan một phần với nồng độ mARN *ASN5* được ước tính bởi qPCR sau 3 ngày của quá trình xử lý (Fig. 13B). Đầu tiên, các sự kiện thể biến nạp dưới sự điều khiển của promotơ E4 thể hiện lượng mARN *ASN5* nhiều hơn dưới sự điều khiển của MMV, xác nhận rằng promotơ E4 kém hiệu quả hơn promotơ MMV để làm im lặng *ASN5*, có thể chỉ ra rằng quá trình tổng hợp protein ASN5 protein xảy ra nhanh hơn và sớm hơn sự tạo ra protein ASN1 sau khi thu hoạch lá (Fig. 7). Trong các dòng nhất định, phần trăm asparagin không tương quan với nồng độ mARN, so sánh, ví dụ, E303-14 với E303-16 hoặc E305-5 với E305-15. Điều này có thể là do thực tế là bản sao *ASN5-T* có liên quan đến các hoạt động không có hoặc chỉ có mặt ở mức nhỏ trong quá trình xử lý lá (Fig. 9) mà bên trong các mô ra hoa (Fig. 10). Sau ba ngày của quá trình xử lý, asparagin cũng được đo, thể hiện biên dạng giảm asparagin đối với 6 dòng này (dữ liệu không được thể hiện) giống như đối với các dòng chuyển gen ASN1 (đã nêu trên).

Lượng Gln, Asp, Glu và nicotin cũng được đo trong các dòng ASN5-ARNi (Fig. 14). Trong các dòng ASN1-ARNi, sự gia tăng Gln đi kèm được quan sát thấy trong các mẫu này thể hiện sự giảm asparagin mạnh được quan sát thấy *tức là,* E303-1 và E303-16 và ngược lại, lượng Gln thấp hơn trong các mẫu này thể hiện asparagin thấp *tức là* E303-14 và E-305-16. E305-5 thể hiện sự giảm asparagin ít hơn 10% và Gln, Asp và Glu được gia tăng so với đối chứng và các dòng chị em E-305-15 và E305-16, gợi ý rằng trong trường hợp nhất định, promotơ E4 có thể làm im lặng một phần các bản sao *ASN5*. Dòng E303-1 thể hiện sự giảm mARN cao nhất (Fig. 13B), sự giảm asparagin mạnh (66%, Fig. 13A) và sự gia tăng có liên quan của Gln (14x), Asp (3x) và Glu (3x) so với đối chứng (Fig. 14A, B và C). Do đó, như đối với thực vật ASN-ARNi, việc làm im lặng *ASN5* dẫn đến sự giảm asparagin đáng kể và sự gia tăng Gln, Asp và Glu. Nồng độ nicotin không thay đổi trong các thực vật ASN5-ARNi (Fig. 14D), như được quan sát thấy đối với các dòng ASN1-ARNi, gợi ý rằng phản ứng này bị mất kết nối khỏi quá trình nicotin.

Các lá ở vị trí giữa thân được cân trong mỗi sự kiện biến nạp và các dòng đối chứng. Dữ liệu này không thể hiện sự thay đổi lớn trong sinh khối lá, khi các thực vật ASN1-ARNi và ASN5-ARNi được trồng trong môi trường được kiểm soát như nhà kính (Fig. 15).

Kết luận là, cả hai họ gen *ASN1* và *ASN5* được làm im lặng trong các dòng MMV ARNi tương ứng, do đó, chỉ ra rằng các bản sao gen *ASN1* và *ASN5* đều có liên quan trong sự tổng hợp asparagin trong quá trình xử lý Burley.

Các phân tích qPCR chéo để xác định liệu các họ sản phẩm phiên mã *ASN1* và *ASN5* có đều được làm im lặng trong các thực vật ASN1-ARNi và ASN5-ARNi tương ứng, được điều khiển bởi promotơ MMV, được thực hiện. Trong bảng 2, dữ liệu này thể hiện rằng trong các thực vật ASN5-ARNi, các sản phẩm phiên mã *ASN1* và *ASN5* đều bị làm im lặng, nhưng điều này ít rõ ràng hơn so với trong các thực vật ASN1-ARNi, cụ thể là đối với các dòng ASN1-1 và ASN1-2. Sự quan sát này dường như là do thực tế là các gen *ASN5* và *ASN1* (S&T) đều rất tương tự nhau, thuộc cùng một cụm gen (Fig. 6). Tuy nhiên, điều này cũng có thể chỉ ra rằng chỉ cần bất hoạt cụm gen *ASN1* để thay đổi sự tổng hợp asparagin trong lá được xử lý.

Việc phân tích sự biểu hiện của *CYP82E4* trong quá trình xử lý Burley chỉ ra rằng promotơ E4 trở nên có hoạt tính đầy đủ chỉ sau khi xử lý 48 giờ, do đó, gợi ý rằng tất cả các cấu trúc gen chuyển hoặc các mảnh gen dưới sự điều khiển của promotơ E4 được biểu hiện muộn trong pha sớm của quá trình xử lý (>48 giờ). Vì thế, dựa vào dữ liệu được thể hiện trên Fig. 11 và Fig. 13, được dự đoán là *ASN1*-T và ASN1-S được hoạt hóa sau trong pha đầu tiên của quá trình xử lý, do việc làm im lặng *ASN1* có thể được điều khiển như nhau bởi các promotơ MMV và E4. Promotơ E4 điều khiển yếu sự làm im lặng *ASN5*, nhờ đó, gợi ý rằng các gen *ASN1* được điều khiển bởi trình tự của các sự kiện có liên quan đến chương trình già hóa lá được cảm ứng.

Ví dụ 4 - các dòng biến thể ASN (thể đột biến EMS)

Các thể đột biến EMS ASN đối với hai bản sao *ASN1-S* và ASN1-*T* và hai bản sao *ASN5-S* và ASN5-*T* được nhận diện. Các đột biến cụ thể được sàng lọc trên ADN hệ gen trong các trình tự exon được dự đoán. Ba đột biến kết thúc được xác định trong các bản sao của ASN1-S *(ASN1-S_W156*),* ASN1-T *(ASN1-T_W156*)* và ASN5-S *(ASN5-S_Q66*),* nhưng không trong bản sao của *ASN5-T*. Do không có đột biến kết

thúc được nhận diện trong *ASN5-T*, một đột biến không phải đột biến kết thúc được chọn lọc mà thể hiện số điểm SIFT là 0,0004 là một ứng viên tiềm năng mà có thể thay thế codon kết thúc (ASN5-T_G59D).

Từ thực vật bố mẹ M2, các hạt con cái mang các đột biến (các biến thể) hoặc không được tạo đột biến trong các gen được chọn (WT các thực vật không phân ly) được xác định kiểu gen, nhận diện và được trồng trên cánh đồng. 10 thực vật của mỗi biến thể được chọn được trồng ở bên cạnh 10 thực vật của thực vật không phân ly WT tương ứng của chúng trong từng lô riêng rẽ để ngăn bất kỳ tác động nào của sự biến thiên thực địa (*tức là* sự thay đổi về phân bón nitrat và đất không đồng nhất). Bốn lá ở giữa-dưới thân được thu ở thời điểm thu hoạch và được treo trên dây trong 2 tháng trong kho xử lý trong không khí. Các lá được tước ra và phiến lá được nghiền thành bột mịn. Asparagin (mg/g) được xác định trong mỗi tập hợp lá. Mặc dù có một số sự biến đổi có thể quan sát thấy do độ biến thiên giữa các lô đất, xu hướng rõ ràng đối với sự giảm asparagin trong ASN1-S_W156*, ASN1-T_W156* và ASN5-S_Q66* so với các vật phân lập WT tương ứng của chúng là có thể nhận thấy, nhưng ngoại trừ ASN5-T_G59D (xem bảng 3).

Phần trăm giảm asparagin ở các giống đột biến ASN được thể hiện trên Fig.17. Sự giảm mạnh nhất được quan sát thấy đối với ASN1-T_W156* (83%), sau đó là đối với ASN5-S_Q66*(44%) và sau cùng là đối với ASN1-S_W156* (17%). Dòng ASN5-T_G59D đã thể hiện sự tăng asparagin nhẹ. Hàm lượng asparagin trong các biến thể ASN có tương quan với mức độ hoạt hóa gen trong quá trình xử lý. Thật vậy, ASN1-T được biểu hiện nhiều hơn trong quá trình xử lý so với ASN5-S và ASN1-S sau 48 giờ và 60 giờ của quá trình làm khô (xem Fig. 8 và Fig. 9). Tuy nhiên, sự quan sát này vẫn nên được thực hiện cách cẩn trọng, do dữ liệu đối với ASN1-T_W156* thu được từ chỉ một lô đất trên cánh đồng và ASN1-T_W156* và các thực vật không phân ly WT đối với dòng này đều thể hiện sự giảm sinh khối mạnh trong thí nghiệm thực địa này (xem Fig.18).

Sự giảm sinh khối trong ASN1-T_W156* và các cụm không phân ly WT ASN1-T_WT* tương ứng của nó dường như là kết quả từ (các) đột biến khác vẫn có mặt trong cả hai dòng biến thể. Thật vậy, các thí nghiệm chuyển gen với các dòng ASN1/5-ARNi nhằm chỉ ra rằng *ASN1-T* và các bản sao bất kỳ khác của *ASN1* và *ASN5* không có tác động lên kiểu hình về chiều cao và sinh khối của thực vật (xem Fig. 15). Các phép lai

với giống cây trồng nền AA37 và sự tự thụ phấn thực vật tiếp theo, sẽ cho phép chúng ta kết luận về tác động của đột biến kết thúc *ASN1-T* lên kích thước của thực vật. Fig.18 còn thể hiện rằng đột biến kết thúc trong *ASN1-S* và *ASN5-S* không có tác động lên sinh khối của thực vật. Điều này cũng có giá trị đối với đột biến điểm G59D trong *ASN5-T* mà dường như là theo sự biểu hiện dữ liệu (Fig. 7 và Fig. 8) tốt hơn là có liên quan đến các mô khác, như hoa (xem Fig. 10).

Thử nghiệm thực địa thứ hai được thực hiện với các thể đột biến kết thúc tương tự đối với ASN1-T (6 lô bao gồm 10 thực vật không phân ly và 10 thực vật mang đột biến kết thúc), ASN1-S (6 lô bao gồm 10 thực vật không phân ly và 10 thực vật mang đột biến kết thúc) và ASN5-S (9 lô bao gồm 10 thực vật không phân ly và 10 thực vật mang đột biến kết thúc). Sau quá trình làm khô lá (6 lá ở vị trí giữa thân), các thực vật mang đột biến kết thúc ASN1-T thể hiện sự giảm asparagin là 19% so với các cụm không phân ly trong phiến lá, các thực vật mang đột biến kết thúc ASN1-S thể hiện sự giảm asparagin là 23% so với các cụm không phân ly trong phiến lá và cuối cùng là, các thực vật mang đột biến kết thúc ASN5-S thể hiện sự giảm asparagin là khoảng 10% so với các cụm không phân ly trong phiến lá. Các kết quả này xác nhận các kết quả trước được thể hiện trong bảng 3, xác nhận rằng các thể đột biến kết thúc được chọn có hiệu quả để giảm asparagin trogn lá được xử lý. Khi được so với dữ liệu asparagin từ các dòng ASN-ARNi, tổ hợp của ba thể đột biến kết thúc ASN1-T_W156*, ASN1-S_W156* và ASN5-S_Q66* sẽ tạo ra sự giảm asparagin tương tự trong phiến lá của lá được xử lý.

Chúng tôi kết luận từ dữ liệu này rằng ASN1-S, ASN1-T và ASN5-S có liên quan đến sự tạo ra asparagin trong quá trình xử lý látrong không khí cho cây thuốc lá Burley.

Ví dụ 5 - Tác động của sự giảm asparagin trong các dòng chuyển gen ASN lên sự tạo thành acrylamit

Phiến lá dạng bột của lá từ các dòng chuyển gen MMV-ASN1-ARNi (dòng E281-6 và đối chứng tương ứng của nó, xem Fig. 11) và MMV-ASN5-ARNi (dòng E303-1 và đối chứng tương ứng của nó, xem Fig. 13) được trộn với 50% bột thuốc lá Virginia để tạo ra huyền phù đặc và nguyên liệu lá đúc theo mô tả kỹ thuật để sản xuất. Các vật tạo sol khí được tạo ra và sol khí được tạo ra bằng cách làm nóng chúng được tham gia các phân tích (chế độ y tế Canada) để đo acrylamit. Các kết quả được thể hiện trong

Fig.19. Asparagin thể hiện sự giảm 88% trong các dòng ASN1-ARNi được chuyển thành sự giảm 70% acrylamit so với cây thuốc lá đối chứng tương ứng. Dữ liệu tương tự thu được ở các dòng chuyển gen thứ hai asparagin thể hiện sự giảm 66% trong lá của các dòng ASN5-ARNi cho sự giảm acrylamit là 40% trong sol khí so với thuốc lá đối chứng.

Acrylamit là marker sinh học (Naufal *et al.*, 2011) đối với người hút thuốc. Sự tạo ra acrylamit cũng được phân tích trong khói từ điếu thuốc dễ cháy (Fig.20). Các điếu thuốc dễ cháy được tạo ra từ lá ở phần giữa thân được xử lý của các thực vật ASN1-ARNi sử dụng quy trình sau. Lá của cây thuốc lá được đặt trong điều kiện là 22°C và độ ẩm môi trường xung quanh là 60%. Điếu thuốc được cắt đầu lọc được tạo ra từ phiến lá sau khi loại bỏ gân giữa. Các điếu thuốc được tạo ra thủ công, được nạp bằng máy nạp thuốc lá điện "Powermatic 2" sử dụng các ống thuốc lá tiêu chuẩn. Trọng lượng của điếu thuốc được cắt đầu lọc được đưa vào trong điếu thuốc thay đổi (khoảng 800mg) để thu được Resistance To Draw tương ứng với 120 đến 140mm water gauge. Mỗi điếu thuốc sau đó, được điều khiển bằng tay cho độ chắc chắn (độ cứng). Khi các tham số được xác định với một tập hợp điếu thuốc được cắt đầu lọc, chúng được giữ nguyên cho hoàng loạt điếu thuốc được sản xuất (200 trên mỗi mẫu).

Trong các thực vật đối chứng, hàm lượng asparagin trong điếu thuốc lá được cắt đầu lọc (Fig.20) có thể so sánh với hàm lượng paragin được đo trong bột trộn đối với lá khuôn (xem Fig.19) và thấp hơn khoảng 10% so với lượng được đo trong Fig. 11. Sự khác nhau này là do vị trí thân lá ở thời điểm thu hoạch, asparagin ở lượng nhiều hơn trong lá phía dưới so với lá phía trên sau quá trình xử lý Burley. Tuy nhiên, sự giảm asparagin trong ASN-ARNi so với thực vật kiểu dại tương tự với dữ liệu được biểu diễn trên Fig. 11 và Fig.19. Thú vị là, sự giảm acrylamit có hiệu quả trong khói của thuốc lá dễ cháy (57%) ít hơn trong vật liệu sol khí tạo ra sol khí (70%), có thể là chỉ ra rằng phản ứng Maillard dẫn đến sự tạo ra asparagin có hiệu quả hơn trong các sản phẩm thuốc lá được làm nóng hơn trong các sản phẩm thuốc lá được đốt cháy hoặc được đốt.

Sự giảm acrylamit cũng có hiệu quả trong sol khí từ các vật tạo sol khí được tạo ra từ phiến lá từ thể đột biến kết thúc ASN1-S (Fig.21). Tuy nhiên, trong trường hợp này, sự giảm được giới hạn do tác động bị giới hạn của chỉ mình ASN1-S đóng góp vào sự tổng hợp asparagin trong lá được xử lý so với ASN1-T, ví dụ, (dựa vào dữ liệu được mô tả trên Fig.17). Dữ liệu này chỉ ra rằng trong cả các dòng gen chuyển ASN-ARNi và các dòng đột biến ASN, sự giảm asparagin trong phiến lá được xử lý đồng thời với sự

giảm acrylamit sau đó trong khói của thuốc lá điếu dễ cháy và sol khí được tạo ra bằng cách làm nóng. Nói cách khác, việc làm bất hoạt các bản sao của gen ASN1 và ASN5 dẫn đến sự giảm asparagin trong chất nền thuốc lá và sự giảm hình thành trong khói của thuốc lá điếu dễ cháy và sol khí được tạo ra bằng cách làm nóng.

Tài liệu tham khảo

Canales J, Rueda-López M, Craven-Bartle B, Avila C, Cánovas FM. (2012). Novel insights into regulation of asparagin synthetaza in conifers. Front Plant Sci. 3:100

Lewis RS, Bowen SW, Keogh MR và Dewey RE. (2010) Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in Nicotiana tabacum L.: functional characterization of the CYP82E10 gene. Phytochemistry 71: 17-18.

Moldoveanu SC (2005) Analysis of Protein Amino Acids in Tobacco Using Microwave Digestion of Plant Material. Contributions to Tobacco Research 21: 451-465

Naufal ZS, Marano KM, Kathman SJ, Wilson CL.(2011) Differential exposure biomarker levels among cigarette smokers and smokeless tobacco consumers in the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2008. Biomarkers 16:222-235

Onoa H, Chudab Y, Ohnishi-Kameyamaa M, H. Yadaa, M. Ishizakac, H. Kobayashia & M. Yoshidaa. 2003. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. Food Additives & Contaminants, 20: 215-220.

Papousek et al.,(2014) Determination of Acrylamide and Acrolein in Smoke from Tobacco and E-Cigarettes, Chromatographia 77: 1145-1151

Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bakaher N, Bovet L, Willig A, Goepfert S, Peitsch MC and Ivanov NV. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. Nat Commun. 5:3833.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến thực vật chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó có sự biểu hiện hoặc hoạt tính của

asparagin synthetaza giảm, asparagin synthetaza đã nêu gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm: (i) trình tự polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7; hoặc (ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i); hoặc (iii) polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 78% với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8; trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii) hoặc (iii) được giảm so với thực vật đối chứng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chế biến nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí được chuyển hóa từ nguyên liệu thực vật đã nêu so với nguyên liệu thực vật từ thực vật đối chứng, phương pháp đã nêu bao gồm các bước: (a) tạo ra thực vật hoặc bộ phận của nó bao gồm polynucleotit gồm có, bao gồm hoặc về cơ bản là bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7; (b) giảm sự biểu hiện của polynucleotit hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi chúng trong thực vật hoặc bộ phận của nó; (c) thu hoạch nguyên liệu thực vật từ thực vật hoặc bộ phận của nó; (d) làm khô hoặc xử lý nguyên liệu thực vật; (e) tùy ý là, đo nồng độ của asparagin trong thực vật hoặc bộ phận của nó và/hoặc đo nồng độ của acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ thực vật hoặc bộ phận của nó; và (f) thu nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô với nồng độ asparagin giảm và các nồng độ được giảm của acrylamit trong sol khí được chuyển hóa từ nguyên liệu thực vật đã nêu, thích hợp là, trong đó nồng độ nicotin về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong thực vật đối chứng; thích hợp là, trong đó sự tạo raglutamin, axit aspartic và axit glutamic được tăng lên so với lá đã được xử lý hoặc làm khô của thực vật đối chứng.

Bất kỳ tài liệu công bố nào đươc trích dẫn hoặc được mô tả ở đây cung cấp thông tin có liên quan được bộc lộ trước ngày nộp đơn sáng chế này. Các tuyên bố ở đây không được hiểu là một sự thừa nhận rằng các tác giả sáng chế không có quyền trình bày những tiết lộ đó. Tất cả các tài liệu công bố được đề cập trong phần mô tả nêu trên được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu. Các cải biến và các thay đổi khác của sáng chế sẽ là

hiển nhiên đối với các chuyên gia trong lĩnh vực chuyên ngành mà không xa rời phạm vi và tinh thần của sáng chế. Mặc dù sáng chế đã được mô tả có liên quan đến các phương án được ưu tiên cụ thể, cần phải hiểu rằng sáng chế như được yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn quá mức với các phương án cụ thể này. Như vậy, các cải biến khác nhau của các phương pháp được mô tả để thực hiện sáng chế mà là hiển nhiên đối với các chuyên gia trong lĩnh vực sinh học tế bào, sinh học phân tử và sinh học thực vật hoặc các lĩnh vực liên quan sẽ nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

Bảng 1

Phần trăm các gốc giống nhau trong vùng sắp hàng trình tự không bị ngăn cách giữa các sản phẩm gen asparagin synthetaza thuốc lá, asparagin synthetaza cà chua và asparagin synthetaza Arabidopsis (ASN).

	AtASNl	AtASN2	AtASN3	NtAS N5-T	NtAS N5-S	NtAS Nl-T	NtAS Nl-S	NtASN3-T	NtASN3-S	Solyc06g0 07180	Solyc04 g055200
AtASNl	100	76,91	77,26	83,01	83,73	85,1	85,27	76,17	76,17	83,9	77,44
AtASN2	76,91	100	91,33	77,22	76,99	78,03	78,03	84,64	84,64	76,82	85,46
AtASN3	77,26	91,33	100	77,4	76,99	78,37	78,37	85,14	85,14	76,99	85,96
NtASN5-T	83,01	77,22	77,4	100	97,88	90,27	89,91	77,16	77,16	93,81	80,2
NtASN5-S	83,73	76,99	76,99	97,88	100	90,85	90,51	77,28	77,28	95,08	79,7
NtASNl-T	85,1	78,03	78,37	90,27	90,85	100	98,31	77,62	77,62	90,34	80,45
NtASNl-S	85,27	78,03	78,37	89,91	90,51	98,31	100	77,45	77,45	89,83	80,2
NtASN3-T	76,17	84,64	85,14	77,16	77,28	77,62	77,45	100	100	75,93	64,73
NtASN3-S	76,17	84,64	85,14	77,16	77,28	77,62	77,45	100	100	75,93	64,73
Solyc06g0 07180	83,9	76,82	76,99	93,81	95,08	90,34	89,83	75,93	75,93	100	79,95
Solyc04g0 55200	77,44	85,46	85,96	80,2	79,7	80,45	80,2	64,73	64,73	79,95	100

Bảng 2

Các phân tích qPCR (các đơn vị biểu hiện gen tương đối) để xác định mức độ làm im lặng của các sản phẩm phiên mã *ASN1* và *ASN5* trong các dòng chuyển gen ASN1-ARNi (ASN1-1, ASN1-2 và ASN1-3) và ASN5-ARNi (ASN5-1, ASN5-2 và ASN5-3) sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu *ASN1p* và *ASN5p*.

	ASNlp	ASN5p
Đối chứng	1	1
ASN1-1	0,35	0,88
ASN1-2	0,54	0,74
ASN1-3	0,10	0,40
ASN5-1	0,31	0,24
ASN5-2	0,50	0,34
ASN5-3	0,16	0,35

Bảng 3

Các phân tích asparagin (mg/g) trong lá được xử lý trong không khí được thu hoạch ở vị trí thân giữa-dưới trong bốn biến thể ASN: ASN1-S_W156* và các cụm không phân ly WT tương ứng của nó ASN1-S_WT*, ASN1-T_W156* và các cụm không phân ly WT tương ứng của nó ASN1-T_WT*, ASN5-S_Q66* và các cụm không phân ly WT tương ứng của nó ASN5-S_WT*, ASN5-T_G59D và các cụm không phân ly WT tương ứng của nó ASN5-T_WT*. Mỗi biến thể và cụm không phân ly WT được trồng cạnh nhau trong các lô riêng để ngăn bất kỳ tác động thực địa không mong muốn nào (*tức là* sự biến đổi về nitrat và đất).

Lô	ASN1 - S_WT#	ASN1- S_W156*	ASN1- TWT#	ASN1- T W156*	ASN5- S_WT#	ASN5- S_Q66*	ASN5- T_WT#	ASN5- T_G59D
1	24,2	20,5	27,5	4,7	20,9	12,0	25,0	26,4
2	26,0	20,6			22,3	16,2	18,5	27,9
3	22,9	20,5			22,0	15,2	17,7	28,0
4	25,7	21,3					28,3	28,7
5	30,9	22,0					25,4	31,9
6	17,4	14,1						
7	18,4	17,3						
% Giảm	17+/-7		83		34 +/- 8		Số	

Các trình tự

SEQ ID NO:1 - NtASN1-S, trình tự ADN hệ gen

atgtgcgggatcttggctgttttgggttgttctgatgattctcaggccaaaagggttcgtgttctcgagctctctcgcaggtaaat
tatatttcccttctttctgtattgttaatgttattgtgttgcgttattatattgattctttttatgagaaagtagtttcctgaacgtttgcatt
ttagaataaaagaagactaaagcttaagatagattatatatttagatattcttgacgtggacctatatcttagattcacaatataattt
tctcggaccaactgttttagcatgacttgtaaatgatgttgatatgaaaagctgtgatttaattagtaggagtaattcatttccatgtt
acaattacttatctttctcctccttgtgttcttgccactgctagaggcagatctataattcctacttagagtattgaacacattgtactt
ttgaaattgtaagtgtgcagtttaatatttgttaaaattttgaaggtttttttaattacatgtatatcgtgacgttatatagcctctctacc
cgcataaggtaggggtaatgtctgcgtacaaataggctgatttcactctgtgttcagttgaatcaatatatgcggcatccaccac
tgtttgcaaatgcatgggaatggaaaagtcatgcctcatcactgtcacacatgatttttatttatttatttattatatatgattctttaaa
tctattagtgggtactgaatcttgctaactgatcgattgatgaaacaggttgaagcatcgtggaccagattggagtgggctgtat
caacatggggactgttacttggcacatcagcgtctagctattgttgatcctgcttccggtgatcaacctctgtttaacgaagata
agacgattgttgttacggtgggtgcttttaatttcatgtttactctcatttcttgctcagtttactgatgaaaacgaaactaatgctga
taactatcaaccaatcaaccacatacaagtaggggtcgactatatgattcattatatcctttcctctattcaaatagttgatgattaa
tttcatgccaaaaatttcaggtaaatggagagatctacaatcacgagcaacttcgtaagcaaatgcctaatcataagttccgga
ctggcagtgactgtgatgtcattgcacacctagtgagtactcatcttccaacttaggaaacatgtatgtatatgtaaaattattccc
tgattatattatgtacattaatcagtatgaagaacatggagaagattttgtggacatgctggatgggatcttcgcttttgtgttattg
gatactcgagataacagctttcttgttgctcgtgatgccattggaattacttccctttatattggttggggacttgatggtaagattc
catatgattttctcacttagattttgttattgcaaatgaatatgttgaatccttatatgtactaattgttgtaattctgttccttctcaggg
tctgtatggatatcatctgagcttaagggcttgaatgatgactgcgaacattttgaagttttcccaccagggcacttgtactctag
caagaatggcggctttaggaggtggtacaatcctccttggttctctgaggccattccttccactcgttatgatcccttagttctca
ggcgtgcctttgaaaatgtgagttaatattgttgttgttgaaatggatccaacatgttggttttaaggctatatatcattttgcaggc
tgttatcaaaaggttgatgactgatgtccccttggtgttctcctctccgggggactcgattcatccttggttgcttcgattactgct
cgctacttggctggtacaaaggctgccaagcagtggggagcacagcttcattccttctgtgttggccttgaggtcagataatct
tgagacttgtgtgattacaacattaataacgacaacacctcattcacaagctagtaaggtcagctatatgaaatctgataccgat
ttgcttgctttcaccgaacagggctcaccggatctcaaggctgcaagagaagttgctgactacttgggaaccgttcaccacga
gtttcacttcaccgttcaggttttgatggagcaactctattttcacttgatctatcatcctcttcgtttctcctttgtttacctgatggca
aatgacatgtgttgtatttgcaggatggaattgatgcaattgaagatgttatttaccatattgagacatacgatgtaacgacaatc
agagcaagcactcctatgttccttatgtcgcgtaagattaagtcactaggagtgaagatggtcatatctggggaaggatctgat
gaagtgtttggtggctacttgtactttcacaaggctcccaacaaggaagagttccacaaggaaacatgtcgcaaggtataaga
aagtgcttccagttcctagtttaaataggacaaggagttgagaaaatgttgatttttttccctatgcagattaaagcgcttcaccaa

tatgactgcttaagagcaaataagtcaacatctgcatggggtttagaagctagagtccctttcctagataaggagttcatcaatg
ttgccatgagtattgatccagagtggaagttggtaagtagttgacccccaattgttgatcgaataaacaatcaactgtccctaaa
actatgtatttattcatttcagattaaaccagagcaaaggaggattgaaaagtgggctctaaggagggcctttgatgatgagga
gcatccttatctcccaaaggtgtactaaatcgccattttcaaactgatttgcaaatgattttgaatgttatattattaatcaaactaac
aatttactcattacattccttgcagcacatcctgtataggcaaaaagaacaattcagtgatggcgtgggctatagttggatagat
ggactcaaagcacatgctgaacaacatgtgcgtttcaatgactaatcaacgactttctactgctcttatttatcttccaatgcttgtt
tgttttaaagctgaccgaggaaacaaatttttttcctttaataggtgaccaataggatgatgtttaatgcttcacatatattccctcat
aacacacccattacaaaggaagcatactactataggatgattttcgagcgctttttcccacaggtaatttgttcagataatagtga
gaatttatgataaatggactaatttacgtttgttgtcgattttgcaaccttccaacagtgtgagcaagctcacataatcggaatttttt
tgttcaaataataatgcattggaaatcataatgctaaattgagatttacttttaaccatgttcctctaccatttttggttctgcagaatt
cagctgggctaaccgttcctggaggagcaagtgtggcgtgtagcacagctaaagctgtagagtgggatgcttcttggtcaaa
gaaccttgatccttcaggcagggctgctattggtgtacataactcggcttatgagaatcatgtacctgctatggctaatgggaat
ttgaccaaaaaaatcattggtcgtgtgccttctatggtagaagttggtgctgctcccgagctcacaataaagagttag

SEQ ID NO:2 - NtASN1-S, trình tự axit amin suy luận

MCGILAVLGCSDDSQAKRVRVLELSRRLKHRGPDWSGLYQHGDCYLAHQRL
AIVDPASGDQPLFNEDKTIVVTVNGEIYNHEQLRKQMPNHKFRTGSDCDVIAH
LYEEHGEDFVDMLDGIFAFVLLDTRDNSFLVARDAIGITSLYIGWGLDGSVWIS
SELKGLNDDCEHFEVFPPGHLYSSKNGGFRRWYNPPWFSEAIPSTRYDPLVLR
RAFENAVIKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVASITARYLAGTKAAKQWGAQLH
SFCVGLEGSPDLKAAREVADYLGTVHHEFHFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTT
IRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVISGEGSDEVFGGYLYFHKAPNKEEFHKETCR
KIKALHQYDCLRANKSTSAWGLEARVPFLDKEFINVAMSIDPEWKLIKPEQRR
IEKWALRRAFDDEEHPYLPKHILYRQKEQFSDGVGYSWIDGLKAHAEQHVTN
RMMFNASHIFPHNTPITKEAYYYRMIFERFFPQNSAGLTVPGGASVACSTAKA
VEWDASWSKNLDPSGRAAIGVHNSAYENHVPAMANGNLTKKIIGRVPSMVE
VGAAPELTIKS

SEQ ID NO:3 - NtASN1-T, trình tự ADN hệ gen

atgtgcgggatcttggctgttttgggttgttctgatgattctcaggccaaaagggttcgtgttctcgagctctctcgcaggtaaat
tatattcccttcttttctctattgttaatgttattgtgttgcatgcgttattaattctttttatgagaaagtagtttcctgagcgtttggagc
tgctactgattgcttgcattttagaataaaacttaagatggattatatatttagatattcttgacgtggacctatatcttagattcaca

attttctcggaccaactgttttagcatgacttgtatatgatgttgatatgaaaagctgtggtttagtaattcatttccatgttacaatta
ctaatctttctcctatctgtgttcttgccactgctagaggcagatctataattcgtaattagagtattgaacacattgtacttttcaaa
attataagtgcgcaatttaatatttgttaaaattttgaaggctttttttaattacatgtatatcgtgtctcgtatagcctctctacccatgt
aaggtctgcgtacacattacccgccccatgccctcccgtgaaattttactggggtttgctgttgttgttggtatcgtgtgtcgcat
atactttgttctgttgaatcaatatatgcgtcatctgccactgtttgcaaatgcatggaatggaaaagtcatgcctcatcactgtca
cacaggatttttatttatttatttattatatatgattctttttcttgatgtgaaatctattagtgggtactgaatctggctaactgact
aatgaaacaggttgaagcatcgtggaccagattggagtgggctgtatcaacatggggactgttacttggcacatcagcgtct
agctattgttgatcctgcttccggtgatcaacctctgtttaacgaagataagacgattgttgttacggtgggtgcttttaatttcatg
tttactctcatttcttgctcagtttactgatgaacatgaaactaatgactatcaatcagccaatcaaccacgcttaattccatacaa
gtaggggtcgactatatgattcattatatcctttcctctattccggttccttttattcaaatagttgatgattaatttcatgccaaaaat
ttcaggtaaatggagagatctacaatcacgagcaacttcgcaagcaaatgcctgatcataagttccggactggaagtgactgt
gatgtcattgcacacctagtgagtaatctagattactcatcttccaacttaggaaacatgtatgtattcccctgattatttcatcatct
ttatgtacattaatcagtatgaagaacatggagaagattttgtggacatgctggatgggatcttcgcttttgtgttactggatactc
gagataacagctttcttgttgctcgtgatgccattggaattacttccctttatattggttggggacttgatggtaagattccatattat
tttctcacttagattttgttattgcaaatgaatatgttgaatctttatatgtagtaactgttgtaatttggttccttctcagggtctgtatg
gatatcatctgagcttaagggcttgaatgatgactgcgaacattttgaagttttcccaccaggacacttgtactctagcaagaat
ggcggctttaggaggtggtacaatcctctttggttctctgaggctattccttccactccttatgatcccttagttctcaggcgcgc
ctttgaaaatgtgagttattattgttgttgttgaaatggatccaacatgttggttctaaggctggatatcattgtgcaggctgttatc
aaaaggttgatgactgatgtccctttttggtgttctgctctccgggggactcgattcatccttggttgcttcgattactgcccgctac
ttggctggcacaaaggctgccaagcagtggggagcacagcttcattccttctgtgttggccttgaggtcagataatcttgagat
ttctgtgattacaacattaataacgaccacacctcattcacaagctagtaaggtcagctatatgaatctgataccgatttgcttgct
ttcaaacgaacagggatcaccggatctcaaggctgcaagagaagttgctgactacttgggaaccgttcaccacgagtttcac
ttcaccgttcaggtattgatggagcaactctattttgacttgatctatcatcctctgcgttccctttttgtttacctgatggcaaatgac
atgtgtcgtatttgcaggatggaattgatgcaattgaagatgttatttaccatattgagacatacgatgtaacgacaatcagagc
aagcactcctatgttccttatgtcgcgtaagattaagtcactaggagtgaagatggttatatctggggaaggctctgatgaagt
gtttggtggctacttgtactttcacaaggctcccaacaaggaagagttccacaaggaaacatgtcgcaaggtataaaaaaagtg
tttccagttccttgtttaaaaccttatttaaataggataagcaacaacaacaacaacaacccagtataatcccactagtggggtct
gaggagggtattgtgtatgcagaccttacccctaccctggggtagagaggctgtttcagatagaaactcgactccctccctcc
aaaaaccttatttaaataggacaaggagttgagaaaatgttgatctttttcctccatctctatgcagattaaagcacttcaccaata
tgactgtttaagagcaaataagtcaacatctgcatggggcttagaagctagagtgcctttcctagataaggagttcatcaatgtt
gccatgagtattgatccagagtggaagttggtaagtagttgaaccccaattgttgatcgaataaacgatcaactgtccctaaaa
ccttgtattctatccatttcagattaaaccagagcaaaggaggattgagaagtgggctctaaggagggcctttgatgatgagg

agcatccctatctcccaaaggtggtactaaatcgccctttcaaactgatttgcaagtgatttcgaatgttatattgttaaccaaac
taacaatttnaaggctctgatgaagtgtttggtggctacttgtactttcacaaggctcccaacaaagaagagttccacaaggaa
acatgtcgcaaggtataaaaaagtgtttccagttccttgtttaaaaccttatttaaataggataagcaacaacaacaacaacaac
ccagtataatcccactagtggggtctgaggagggtattgtgtatgcagaccttacccctaccctggggtagagaggctgtttc
agatagaaactcgactccctccctccaaaaaccttatttaaataggacaaggagttgagaaaatgttgatctttttcctccatctc
tatgcagattaaagcacttcaccaatatgactgtttaagagcaaataagtcaacatctgcatggggcttagaagctagagtgcc
tttcctagataaggagttcatcaatgttgccatgagtattgatccagagtggaagttggtaagtagttgaaccccaattgttgatc
gaataaacgatcaactgtccctaaaaccttgtattctatccatttcagattaaaccagagcaaaggaggattgagaagtgggct
ctaaggagggcctttgatgatgaggagcatccctatctcccaaaggtggtactaaatcgccctttcaaactgatttgcaagtg
atttcgaatgttatattgttaaccaaactaacaatttactcattacatttcctgcagcacatcctatacaggcagaaagaacaattc
agtgatggcgtaggctatagttggatagatggactcaaagcacatgctgaacaacatgtgcgtttcaatgactaatcaacaac
tttctaatgttcttatttatcttccaatgtttgtttgttttaaagctgacttggaatttttttgtttcctttaataggtgaccaataggatgat
gcttaatgcttcacatatattccctcataacacaccgattacaaaggaagcatactattataggatgattttcgagcgctttttccc
acaggtaatttgttcatgtattgtgaggattcatgataaattagctaacttatgctggttttcaaccttgcaaccttccgataagtca
cattgttggagtttgttgttcaaatgcgagatttacttttaaccatgttcctctggtatttttggttctgcagaattcagctgggctaa
ccgttcctggaggagcgagtgtggcgtgtagcacagctaaagctgtagagtgggatgcttcttggtcaaagaaccttgatcct
tcaggaagggctgctattggtgtacataactcagcttatgagaatcatgaacctgctatggctaatgggaatttggccacaaaa
atcattggccgtgcgccgtctatggtagaagttggtgctgctcatgagctcacaataaggagttag

SEQ ID NO:4 - NtASN1-T, trình tự axit amin suy luận

MCGILAVLGCSDDSQAKRVRVLELSRRLKHRGPDWSGLYQHGDCYLAHQRL
AIVDPASGDQPLFNEDKTIVVTVNGEIYNHEQLRKQMPDHKFRTGSDCDVIAH
LYEEHGEDFVDMLDGIFAFVLLDTRDNSFLVARDAIGITSLYIGWGLDGSVWIS
SELKGLNDDCEHFEVFPPGHLYSSKNGGFRRWYNPLWFSEAIPSTPYDPLVLR
RAFENAVIKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVASITARYLAGTKAAKQWGAQLH
SFCVGLEGSPDLKAAREVADYLGTVHHEFHFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTT
IRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVISGEGSDEVFGGYLYFHKAPNKEEFHKETCR
KIKALHQYDCLRANKSTSAWGLEARVPFLDKEFINVAMSIDPEWKLIKPEQRR
IEKWALRRAFDDEEHPYLPKHILYRQKEQFSDGVGYSWIDGLKAHAEQHVTN
RMMLNASHIFPHNTPITKEAYYYRMIFERFFPQNSAGLTVPGGASVACSTAKA
VEWDASWSKNLDPSGRAAIGVHNSAYENHEPAMANGNLATKIIGRAPSMVE
VGAAHELTIRS

SEQ ID NO:5 - NtASN5-S, trình tự ADN hệ gen

atgtgtggaatcttggctttgttgggttgttcagatgattctcaggccaaaagggttcgagttcttgagctctctcgcaggcaattt
ccccttttcttttctcttttatttttattactccatcatataattattctactttcacctttttgtttttttaatttcgatttgtttgctttttgctttctt
catttaatgttcttgcattgctctagctcctatacgaataataggagctaaagtaatagagtgaaggattattttggagcaacggt
aaagttatttttgtatagttcacaggttggagccgtaaaagcagttactagtgtttgcattagggtaagttgtctatcaggaaagat
atttgtagcaattgaccacccttttggcaaaaaattatgcgtaaaatattactacttgttattgattcaaaaaatatgactttgaacat
ccttgtatagcctagtggcaaagggtgttcaaaatttttgaacacctttattgaattttctggtttcgtcgttgctgtctacaacaca
ctctcgaagtgcggccttccctcaaaccctacgtgaatatggaacgcctagtgtgccgggatgccctttaggctgagtaatag
agtactatgttgatatacctaaaatacggaactggcacgagagataaattcagaatttatagcttaattatttaaaatttatcatttg
atttatttcaaccagagttcattctagtagagtttatgttgcatatttgtctgatttgcaccatttgttttaatgttcttgcattactctaat
ttatttatgaataataagctaaactaattgagtttatgttgatgtaactgacctgagttggcagtgatgtttggctacttgaatttaaa
acaagattaagacttgtgagttggcagtaattgtttggatacttgaatttagaacaagaataaaacaagattaattaaggatacat
tattcctaacccggaccctaattctatagattgattattaaatttttcttggaccaaccgtcaccgtgacctgttcatgatggtgatg
gcaaaagccataatacacttgatttctgttttcaatttttaaggttcttattattatacttattatatactttgaaaattatgggtcaaaat
tttaatatttgttattccttccgtatgtttgactcaacttggagttcatgaaaaaaaaaaaaaattttttttaaacttgtggtcttaaacaa
gtcatcgatatatgtgtggttgtgaatcgcctcgttaggataaagtagaaattttaaagttaaactatttcgaaataaaaaagtatg
atagtgtttttgggacatactaaaaaggaaataacacataaaatggaacaaagaagtatattttagtgatttttcacatatatatca
gtattttgtatcaaaaatgctggttcagttgaactcattgaactgggtgctccatccacctccgagtactgcaacatgtgaccgg
tggcagatgcaacccttacgtaccagggtcatctgaacctagtataaatatatttgtgaaaaatccctaaaatttcaataattagt
agatttaaaaccttaattttaaaactacaatgagttcagttttaaaatctttatatgtcaaacctatcaagattaaatcctggatccac
cttttgcatgtgacagtacaatagccttttgtaattgaaacaaatatttgaattttggtaactatttgatcacataggttgaagcatc
gtggaccagattggagtgggatatatcaacatggtgatttttacttagcacatcaacgtttagcaattatcgatcctgcttctggt
gatcagcctctgtttaatcaagataagacgattgttgttacagtgagtgcctctaatttacctctttttttttttctttttttttttacgatcg
cgttgtttagattatttatggatgaaaatttgtatatttgattattgattgtgtgctaaattttgcaggtcaatggagagatttacaatc
atgagaaacttcgtaatcttatgcctaatcacaagttcagaactggaagtgattgtgatgttattgcacatcttgtgagttagttta
cttttctcattgaccaacttaggccagtgaattatattaggaatttcgggtgtttggatatggtcaaattagcttataagcacttatta
tcaattttaacatttttatccatacacgtaactgttcattcataaagtcattttagcacttgatgctcatcaacctatgttgttgggact
cttcgaaaatgtcagcccgatagcatttcggagagtccgagcaacatagcaatcaactacttttaatcagttaaacgaacatgc
tcatagtgataacctctggaaaatatgttatagtaaattagaaaaatttatacgatgtctcactatcggtatgtattgatcagtatga
agaatatggagaaaattttgtggacatgttggatggggtgttctcttttgtattgttggatacgcgcgataacagctttcttgctgc
tcgtgatgcaattggaattactcccctatatattggttggggacttgatggtaagattttctatacaattttccagttagaaattaaa

actgaagctattcctatttactattgaagaatcttgatacatgttatttggtatttcgtcgtgttgttatgtctcaggctctgtgtggatt
tcatctgagctaaaaggattaaatggtgactgtgaacattttgaagttttccctcccggtcacttgtactcgagcaagaatggcg
ggtttaggagatggtacaatcctcaatggttctctgaggctattccatcaaatccttacgacccccttagttttgagacgtgccttc
gaaaatgtgaggcttgttaatgaatctagtgtacaatcttggatgtttttctctcgactttggttttagcactcaaaaagttgtctgta
caaacgatcttggctataaggagtggtggttaattttgcaggctgttatcaaacgattgatgaccgatgtccccttttggtgttctg
ctctccgggggacttgattcgtctttggttgcttctgtcactgctcgctacttggctggaacaaaagctgctaagcaatgggga
gcacagcttcattccttctgtgttggtctcgaggtcagactatcaatcctgagcggagacatatttggggcgggttctgtgggtt
caactgaacccattgcttttggttcgaaccatatatacaaatccaagaaaatataagatgtgtacatataatatgacactcattct
gagcctactgacgctagatactggactcgcctttggtcttgagactttataatagaaaatagatattcaataccaatttctgtttttc
ttttctgactgacagggctcaccagatctcaaggctgcaagagaagttgctgactatttgggaaccgttcaccacgagttcac
cttcacagttcaggtttgtaaatcgtgttgctactccgatttattcatgtgagtctcttctgttttcctcctagaaagcaacaagtgtt
catgttttgcaggatggaattgatgctattgaagatgttatttaccatatcgagacatacgatgtaacaacgatcagagcaagca
ctcctatgttccttatgtcgcgtaagattaaatcactgggagttaagatggtcatatcaggggaaggctcagatgaactgtttgg
cggctatttgtacttccacaaggctccgaacaaggaagaattccatgtggagacatgtcacaaggtaataaaacacgtcggc
tcccttggcaagtctgattctccttgtcattgtttgtctcgggttggaataaattgctataattcgagaagaaatgttaatcctgctct
ttcactcgcatgcagataaaagcgcttcaccaatacgactgtttgagagcaaataaggcaa
catcagcatggggcttagaagctagagtaccatttctggataaagagttcatcaacgttgctatgagtatcgatcctgaatgga
agatggtaacaaaactgagctccaattgtcaatgagatgagaagcataactgaatatgcacgttctctaaaacttgtttttcatcc
gtttcagattaaacacgatcatggtaggatcgagaagtgggttcttaggaaggcttttgatgatgaggagcaaccctatctccc
aaaggtccacaaagtcatgtttttcctactgatttgccgattagtatggatcaaaactaacatgttttgttcttttatgtactctgcag
catattctgtaccggcagaaagaacaattcagtgatggcgtaggctatagttggatcgatggactcaaagcacatgctgaaca
acatgtgagcttctaaataaatccagaactattacatcgttatcgtccaattttcgtttgttttgctgtcagctgatcttggaaacaat
tcttttctctcaggtgactgataggatgatgcttaatgctgcacatatcttccctcacaacactccaactacaaaggaagcatact
attacaggatgattttcgagaggttcttcccacaggtacttatagcgcgagactagaatcatatatctcttaaatggaaacatga
aaaataaaggaggtgtttttttctccttggaaaaagtatttactactgattaaagcaccttcattcacccatcttgctacttcgcgtac
tttactaagttgtggttctaaaaaagaagatttagcttggtatattccatcacgaggaagccacaaaaagattctacttataagaa
gttggatacttttaatggtgtgagacctttgggaaaaaccatgcgggcttggcccaaagccgacaatatcacaccatgttaag
agtatctttgcttcgttttagccaaacagtacaataagtcaatttttaaaccatgttgttactattgttggatttgcagaattcagcaa
ggctaactgttcctggaggaccgagtatagcttgcagcacagctaaagctattgagtgggatgcttcgtggtcgaacaacctt
gatccttccggtagggctgcaatcggtgtacataactcggcttatgacgatcatctccccgatgttggtaatgggaatttggac
acaacgatcatcgataatgtgccgaggatggtaggagtgggtgctgctgcagagctcacaataaggagctag

SEQ ID NO:6 - NtASN5-s, trình tự axit amin suy luận

MCGILALLGCSDDSQAKRVRVLELSRRLKHRGPDWSGIYQHGDFYLAHQRLA
IIDPASGDQPLFNQDKTIVVTVNGEIYNHEKLRNLMPNHKFRTGSDCDVIAHLY
EEYGENFVDMLDGVFSFVLLDTRDNSFLAARDAIGITPLYIGWGLDGSVWISS
ELKGLNGDCEHFEVFPPGHLYSSKNGGFRRWYNPQWFSEAIPSNPYDPLVLRR
AFENAVIKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVASVTARYLAGTKAAKQWGAQLHS
FCVGLEGSPDLKAAREVADYLGTVHHEFTFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTTI
RASTPMFLMSRKIKSLGVKMVISGEGSDELFGGYLYFHKAPNKEEFHVETCHK
IKALHQYDCLRANKATSAWGLEARVPFLDKEFINVAMSIDPEWKMIKHDHGR
IEKWVLRKAFDDEEQPYLPKHILYRQKEQFSDGVGYSWIDGLKAHAEQHVTD
RMMLNAAHIFPHNTPTTKEAYYYRMIFERFFPQNSARLTVPGGPSIACSTAKAI
EWDASWSNNLDPSGRAAIGVHNSAYDDHLPDVGNGNLDTTIIDNVPRMVGV
GAAAELTIRS

SEQ ID NO:7 - NtASN5-T, trình tự ADN hệ gen

atgacgtagtttagcttgttcgtccacggcataaaaacgcctataaattcggtggtcattttggttcatttacagaatcccacgat
catcttttgtgtattatcattttgccttctttacgtgttcttctctcccaaaatcctgcaaatctttaactatcttcccatatttctctccct
ctttctctttcttttttgttatctactttactacttctattagtagagctttatccaattaaagtcatctatattggatatagtttttactactac
tttatcttgtttgggaaagaaaagaataaaaaattagagtgtctatattaagtataaaaaggtgaaaaataaaaaagtagtgatc
aatcatgtgtgggatcttggctttgttgggttgtccagatgattctcaagccaaaagggttcgagttcttgagctctctcgcagg
caattccccttttcttttctcttttatttttattactccatcatattattcaactataatttcacctttttttgtttttcaattaatatttgtctgctttt
gctttcttcatttaatgttcttgcattgctctagttcctttatgaataataggctaaagtaatagagtgaaggagtagagtcggagc
aacggtgaagctgtctttacatgatctatagctcacgggttcaccatagaagcagccaatggcgaagctagaaaattcaataa
gggtgttctttccttttgccagtgggctatgcaagggtgttcaaagtctatttttaatcaataacaagtaatattttatcttatagtgaa
agcaaccactaatacttgcatttaggtaattagctgtctatcaagggaagttatgtgtggtaagtagtggcggagccagaatttt
cgttaaggggtgtcaaaatatataaaagtaaacataccaggaaattaaggggagtcaatacatagtatatatacatataatttatt
ttttacctagctatacagtatatttttttccgcgaagtgacacccttcctataaggtggctccgccactggtggtaagggtggtc
aattgaacacccttcgccgaaaaattatactctggatggtgtaaaatattactacttgttactgattcaataaataaatttttgaaaac
ccttgcatagtctagtagcaaagagtgttcaaaattttgaacacatttattgaattctctggtttcgccactgctgtctacatcacat
cccttaaggtgcgatctttttttcgaatcatgtgtgaatacgggatgccttgtgttccaggctgccccttttaggctaaagtaataga
gtacgtcttaattcttatgttgatcatatacctgaaactcggaactggcacgagagatataaattcagaatttatagcaaatttatc
attatgttgcatttgttttaatgttcttgcattactctaatttttttatgaataataagctaaactaattgagtttatgttgatgtaactgac

ctgagtttggctacttgaaagttaaaacaagattaagacttgtgagttggcagcgattgtttggatacttgaacacgtttaaaaca
agattaagacattatgatggatacattattcctaacctgggtgggacctaattctatggattcattattaaaatttcttggacaaac
catcaccatgatctgttcatgatgtttatggcaaaagccataatacactttatttctgtatcacaactactttatacacatgttataga
gttttaaaattattttaatatttgttattccttgagtctcctgatatttgactccgcatgaaattcaagaaaaaaaaaagaagatttta
aaatttatagtcgaaaacaagccatcgatatatgtgtggttgttaataacctcgttaggcgtaaagtagaaattttaaagttaaact
atttctaaataagaaaatatgatattgtttttgcatagactaataaggaaagtatgacaagtaaaataaaacaaagaagtatatttt
aatgatttttttccgtgtcaaaaatgtcagtttagttgaacttgaactcattgaaactggtgaccagtggtggatgcaaaccttagg
tacggaggtcatccgaacctagtatagttatatttgtgaaaaatcactaaaatttcaataattactagatatgaaaccttaattttaa
aactacaatgagtgcagttttaaaatctttaaatgtcaaaccgatcaagattaaattatggatccacctttaaatgtcaaaccgac
agtacaatagccttttgcaattgaaacaaatataaacattacatttattaaactagttttaattttggttactatttgattacataggttg
aagcatcgtggaccagattggagtgggatatatcaacatggtgatttttacttagcacatcaacgtttagcaattatcgatcctac
ttctggtgatcagcctctgtttaatcaagataagactattgttgttacagtgagtgcctctaatttaccctttttttttgtggacgaatg
cgttgtttagattactttaattatggctgaaaatttgtatatttgattattgattgtgtgccaaatgttgcaggtcaatggagaaattta
caatcatgagaaacttcgtaatcttatgcctaatcacaagttcagaaccggaagtgattgtgatgttattgcacatcttgtgagtt
agtttactttactcatcaaccaacttaggctagtgaattcaaaggcggagctagaattttgagtatatgagttctggaatttagga
caagataagttactgggttcggatagattatttagacatattaagtagatttcttaacacaaatacacggcccgagccgaagcta
ttgggttctgccgaacccgtagctagacttgtagctccgccattgagtgaattatataaggaatttcgggtgtttgggtaaactta
taagctggtcaaattagcttataagcacttattatcaatttcaacatttctatccaaacacgtaactattcattcgattttagcacttg
atgcttatcgactacttttaatcagttaaacgaacaggctcatagtgacaaactctagaaaatatggtattgtaaattagtagaag
aatttatacgatgtctcactatcgatatgtattgatcagtatgaagaatatggagaaaattttgtggacatgttggatggggtgttc
tcttttgtattgttggatacgcgcgataacagctttcttgctgctcgtgatgcgattggaattactcccctctatattggttggggac
ttgatggtaagattttctatacaattttccaagtagaaattaaaactgaagccattccaatttgctattgtagaatcttgatatatgtta
tttggtatttcaggctctgtgtggatttcatctgagttaaagggcttaaatgatgattgtgaacattttgaagttttccctcccgggc
acttgtactcgagcaagaatggcgggtttaggagatggtacaatcctcaatggttctctgaggctgttccatcaaatccttatga
ccccttagttctgaggcgtgccttcgaaaatgtgagaaatgaatctaggaggtttccctctcgactttggacttagcactctaaa
aatttgtctgtacaaacgatcttggctataaggagtggttgttaatttcgcaggctgttattaaacggttgatgaccgatgtaccct
ttggtgttctgctctccgggggacttgattcgtctttggttgcttctgtcactgctcgctacttggctggaacaaaagctgctaag
caatggggagcgcagcttcattccttctgtgttggtctcgaggtcagtcaatcaatcttgagtagaaaaaatttagggtcggttc
tgtgggtttaacttaactcattgcttttggctcgaaccatatatgcaaatccaaaaagatttaagatgtatacatataatataacact
cattctgagcctactgacgctagatactggactgtgcctttggtcttgagacttttgtaatagaaaattgatattcaataccaatttc
tgttcttttgtgactaacagggctcaccagatctcaaggctgcaagagaagttgctgactatttgggaaccgttcaccacgagt
tcaccttcacagttcaggtttgtaaatcgcgatgctacttcaatttattcatgtgaggctcttctgttttcctactagaaagcaacat

gtgtgcatgttttggcaggacggaattgatgctattgaagatgttatttaccatatcgagacgtatgatgtaacaacgatcagag
caagcacccctatgttccttatgtcgcgtaagattaaatcacttggagtgaagatggtcatatcaggggaaggctcagatgaa
ctgtttggtggctacttgtacttccacaaggctcccaacaaggaagaattccacacggagacatgtcacaaggtaataaaaca
catcggcaagtctgattctccttgtcattgtttgtctcgggttggaataaattgctataattcgagatatggaatgagttaagaaat
gttaatcatgtttttccattcgcatgcagataaaagcgcttcaccaatacgactgtttgagagcaaataaggcaacatcagcatg
gggcttagaagctagagtaccatttctggataaagagttcatcaatattgctatgagtatcgatcctgaatggaagatggtaag
aaaactgagctccaattgtcaatgagacgagaagcataactgaatatgcgcgttctctaaaacctgtttttcatccgtttcagatt
aaacacgatcaaggtaggatcgagaagtgggttcttaggaaggcttttgatgatgaggagcacccctatctcccaaaggtcc
acaaactcatatttttcctactgatttgccaataattatggatcaaaactaacatgtttgttctgttatgtgctctgcagcatattttgt
accggcagaaagaacaattcagcgatggtgtaggctatagttggatcgatgggctcaaagcacatgctgaacaacatgtga
gcttccttaataaatccagaactaatgcagcgttatcgtccaatttttgtttgttttactatcaactaattttagtcatgttagtatgttta
ccttaggtactatgtttttaaggagtttttagtcgtgtcaagaatttattcgctggtaaaaaatagattgaacttccagtattttctact
tttattatgcatatgattggactgagatgaggttaaatggaacaacatggttgaggattaatataaccaattccaacttggttgga
attgaggcgtcgtagttgttgttagatctcagaaacaattcttttctctcaggtgactgataggatgatgcttaatgcttcacatatc
ttccctcacaacactccaactacaaaggaagcatactattacaggatgatttttgagaggttctttccacaggtaatattagtgag
agattaaaatctatagattttgtttatggctgaggtttaaatcatagatttcttaagctcaaaaactaaaaccatgtccctgctactg
ttggatttgcagaattcagcaaggctaactgttcctggaggaccgagtatagcttgcagcacggctaaagctattgagtggga
cgcttcttggtcgaacaaccttgatccttccggtagggctgctatcggtgtacataactcagcttatgacgatcatctacccgat
gttagtaatgggaatttggacacaacgatcatcgataatgtgccaaggatggtaggagtgggtgcttctgcagagctcacaat
aaggagctag

SEQ ID NO:8 - NtASN5-T, trình tự axit amin suy luận

MTLKHRGPDWSGIYQHGDFYLAHQRLAIIDPTSGDQPLFNQDKTIVVTVNGEI
YNHEKLRNLMPNHKFRTGSDCDVIAHLYEEYGENFVDMLDGVFSFVLLDTRD
NSFLAARDAIGITPLYIGWGLDGSVWISSELKGLNDDCEHFEVFPPGHLYSSKN
GGFRRWYNPQWFSEAVPSNPYDPLVLRRAFENAVIKRLMTDVPFGVLLSGGL
DSSLVASVTARYLAGTKAAKQWGAQLHSFCVGLEGSPDLKAAREVADYLGT
VHHEFTFTVQDGIDAIEDVIYHIETYDVTTIRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVISG
EGSDELFGGYLYFHKAPNKEEFHTETCHKIKALHQYDCLRANKATSAWGLEA
RVPFLDKEFINIAMSIDPEWKMIKHDQGRIEKWVLRKAFDDEEHPYLPKHILYR
QKEQFSDGVGYSWIDGLKAHAEQHVTDRMMLNASHIFPHNTPTTKEAYYYR

MIFERFFPQNSARLTVPGGPSIACSTAKAIEWDASWSNNLDPSGRAAIGVHNSA
YDDHLPDVSNGNLDTTIIDNVPRMVGVGASAELTIRS

SEQ ID NO:9 - NtASN3-S, trình tự ADN hệ gen

atgtgtggaatactagctgtttttggttgcattgataactctcaggccaagcgttcccgaatcatcgaactttccagaaggtttctt
ctttttattgctttccgattttctacagcattcttattcttctggggtgtcaatggtatgcatgtgttttggatttgctattcgtgaacttgt
tcgctttctcgtggtcttcgatttatttttgtcaatttataatcagcgtttttgtatggatttctcttttgaatctctcaaatatatgacatt
tgatttcctcgagaaaatttggcatttttatggttcttatgatatgtggttaacccctcgctctgcatcgcttcagcgctttaaaaca
cgaagtgatggctattagtaatactgctagagtggttattgaattacattaaataacgggttgctagtagatcaaattcagaatga
cagtgaaatatctctggaaacttgaatccccgttcgattcgctggtaaaacctggctaaaaaatagctttatctcaaaggagagt
atgtcactgtgaaattggtggtatgtgttgtttaaggcatgatatgctgctcttaggtgatgtcaagatgataataccatccttttca
cactagactcagctttgtagcacttacatctcagttaatcgatggaggaaaatctagtctgctttggggcatattataccaaatgt
cttccttttgttttctagtgttgtttctcaagaattgaaaaaccaatctacaatatagtgatataattaactagttaactcttcctgtgttt
tctgaaaatttccaataattgagaagtgtttactggtcaattagtaaagggagaacggaatatttttttcctctaaagaacttctcttt
ttccatacagaatgactttctatacaaggcctaagtctaatttagtgtctgcgattaagcatcttctgggaacttcacacttgaaag
aagtagaactaggaggggggcaggtctagaaagataattgcttcagtcatttctcataaaaaacattgcttcagtcattatgtgca
ttcatatagagttggtcaagctgctaagctgagctaatagtatgatagctgtgactctcgacaaagtaggttgcctcttagggct
ttatcctttggctccgtaaagaatttctttgggagggctccagagtgggtaggattgttctcatggtaagctgtaacaccaacga
aacaagcctttgtagctgtggaagtccgaggggggtggtggtggtggtggtgtgagagttagagtggtggaggagaggg
ggaggagtgaagagaagtttatattttaaagaatagggccttgagaacttttagtagtgagcatgcattattattattgttattgtta
ttattattattattattattattatattattattattattatattattgttatgtaattacttagctaatgaggtttttccaactgtttcca
aattaggaaatgtgttgaaagcatagttaagtatataaaagcgtgttctttctaatatccttagcttttagagcagataatcacaaa
atttatcatgataatatagcagacaatttttcctagttcaaatctcatgccacccttcataaaaaatttccacgtgcttggctggcat
gttaggggacgtcttggcataattaaacaaatagaattgtccctttctaacagcttaagcttttagatgaggcggtcaacaattca
acaatttgcatttgtttgataagaagatattaaaagaaccttaaaaggtgtcagtatgtgaacaaactcaaggggtagactaact
agaagtcaatttaaattttctgcttgtctgtgttttacttcttttgcactatagaaattgcatttccagcattccgaaagctgcttccttt
gcatatagacttcacatttccagcgtttctgataagcgttcttgcttattcctgtccttctacttggttgattctcctctcacttagttca
ctatcttcttgcacgcattttcaaattgttttatcaattctcttgctttcttttcatctgaccccacaaaatacctcccaaaagcctttct
gcttttccgagtctgaaattatctgcttattactgcctttcaagtattctgatgcgttgactgttttttttcccttgtagtaatgcatggtt
cgctgtccaatctctattttgtttttttgtgaaccactattctttgttgcttctgtttcgtcatcctcagttccccatcttctcagtttgatttt
cctcatttaaaaagcgtgtgccccttttcttgtgctaccctctaaaaaatcagttgctgtcatctcgtttgatctgtcatgatcccag
ttgatgccacatgtttagttctttacctctggacaacttttacttcctgagaaccacgatttcttttcctgaagaaattcttagaaattg

gttatgtaaaggaaattcccagcaatcaccatttggcctctacctggcttgcttttcaacttaccgacacgtgttcatccccttttaacagatgctgaccattatcttctgcttgttggggcatacttcttacccatggtgttaaccctgatctttcgtatcacatttttcaactcttaattctcacatgtaaagtgcctatctttgcctctttagttgatcttgggttgggctgttaatccaaattctctgggctttgctttgaagtatgataagcggtagctttactacagtaccatattctacattgctacagacgtgaaattatcctgatttgtctttgatgtgatgtctggcaagtgtagattacgccacagaggacctgattggagtggattgcatagccatgatgactgttatcttgctcatcaacggttggcaatagtagacccaacttctggagatcagccactttacaacgaggacaagaccattgttgtcgcggtatggaaatatttattatattttttcttagatattaccggtacatggactttggacaatatttgtgcgttttgatcttctatagtacaaacttttctcgtaggataaatttcctctactttgaatggatcttaacaggaaaatcggaataaacaatttgtgatttcgaaatttttagttcttacatatttggaacatatgcggtaaagtaactaggcgattgactaggtgaatacggagaatttcctctactgttatcaatatttactcagctcatttgaaagatctctgggtcgtctagcagtacagctatttaggcaacttaaccaaatccccttcccatgtgtttcactttcttgacttatttatatttgacattttgcaatgccgaaaataaattgtttttccattttatgacctttaaaatgttgaggtgaagggctaggcggtactttaattgacttatcagcaacaatgtattagatacagagcacaaacttgtttgggtgcctaatttggtatttttgagaacgatggagtaaatggaaatatgaattagcaaaatattgaaatagtagatctgaaaaatgaatgactgaatttagaggaggacctttcttctttccttgctgaagtggttataagagaattatgtgaagaacatgtaagctttagggtagtgttacaccataacagtcatgctttccctcaactattagtgtagctgatgaatgctttcagaaatgtggctgttttttgctgcgtattttatgtctttcatcatctcaaaatttattgtgttttaacactgcttggaaggcctagagtcttccgaaaatagtaggttgagaaaacatgagtaagcaaatttcttcctgctggcaattaatcgtttttatatgaggtgaagccacacaatctaacatggtcttagacataaaaatattatttttgacatagagcagacagaaatcttgggtctagttgctatctcccttcctaataagatgccctctatcctcattgctatatcccaaaacagattcacactagaatgaataaatctctccttgcagccacatttatattaataagtagtgtaacaccaaaacatttgtgcttctgcaaagtctgttgaagtggacgattaagtaataaattgtgtgagtttgactgaagagaaagtaataaattgggtgagcttctcacatttttcaggataatgtcaattcatctgattgaacttttgaaggacatctccttttctaaaagtttttgttcacttcctgaaaatggttgctttcccaaatttattctcctgtattttccttgtgctttttttttttaccaggatgactctggccttccctttgcaaatagtgacttcattacctttaacaaaagaccaaatagcctttgtatgcttgaaatcgaagcagaatttacggctcaatttctctaggagatgtgtagcagtaacataaaacgtggttaaagcaacttgtaagcactgccactgtccaatttgacatgactctattactatttagagtgtcaaatagtgtttcttttgactaccaatttttcaatttctttttatacctttttttctttgactgtgacttatagtatattttatgtagtttcagaatatatattttagtttttaaagaattgatgtctgaaagtacagccaattagatggtttcaccctcgtactttaaatcttataagttgtcttaggttaaaggaataatatgcatgattacattgtttggattgatattcagaagatcaaatgtgccggacaaaagcttgcagaagatataattctgtcattttgttgtttagataaactacccttgtcaaatacctaaaactaattcatacttttcaggatccttcttgattggactactctgatcttcttccatatattgatatcctattctttttgcttttaggttaacggggagatatataaccatagagacttacgggaaaagctgaagtcccaccagtttcgaactggcagtgactgtgaagttattgcacatcttgtaagtactttcagaatatatttagataactatacatgacttctcagtttctgtgcgcagaatgatttcaaaataccatgactcaaatttttcatcaaaagcgaaaaaggtggattgtagtaggagaatgagatttttttgtcataatttctttcttatggtacttgaactccgcaatctacctatcgcagtatgaagactatggagaagacttcgttcacatgttggatggaatgttctcctttg

tgcttcttgacacccgtgataaaagtttcattgctgctcgggatgcaattggcattacacccctttatatgggatggggtcttgat
ggtatgtaattgttccatttcataatttttggtatattgtccttttaataaatagcccgtgagctatatgaagttcctttgttgtttccttgt
tttttatttgactgatgtatctttgttgttttgcctactattaggggtgtcaatggttcggttcggccggttattttataaaatttgtacca
taccaatttttaggttattctattatgtataaccaaaattagacttttgaaaccgtcccaatcatgtcggtttctcttcggtatcggta
cggttcggttaattttcggtatttttttaatatcatgtaaaattcaccagtagaagtagaattgcaataacatacattcttttataggac
ttagcaaaactctctagatatttttactgtttaaagggtgatgaattaaaaaaaaagaaaagaaagatggctagaatatagatcc
atcaactattatacaacagcgtaaaagaaatcaaacaaagacaaagaaaatattaatcacacgagttgaaagatataccaag
gtaggactcaagaataaagtctatagaagattaaatattcaaaaagataaatctaaattatatgaaaggaaacatattcaattcat
tgtagtttgctactcataatcgctagaatactttgtgtcttgctaataaagatacttgaaataatttagtttaagtagaagtagcataa
taggttttatgaattagtattttgagtttaattacttgttggcttgtaataattttcataattccaaggctcaaagaaaatttattgcatta
ttatttttaaacttactaaataaatatattttctacatgtaaaatttattcggtatggttctgtatttttttcggtttatttttataaaataaaaa
acctaccctaattatcggtgcggttgtagatttatataaaaacctacggtttcttaaaaagaaagctaaaaatcggttcggtgcg
gtacggttcggtcggtttagtcgattttcgaatatccattgacacccctacctactataatgctggtctcatgctgttgttacaaac
aaatgatgtataatagtgcatagtacatgttttcttgccgctgtagatcaacaatgtaccaagaacatctgtcttagctagttcaac
ctaatcttcagttatctatcattccagtgaataacacatatagagttaggccgacattacctaaggccaactatacaacattgtga
ggtgcgactaaggaactctgaacactgatcgggagaaaaagcaacttatccgtgtttgttttgaagtactatgaggaggcagc
aaccttgctggatttatcacttgacagtaaatgtcaatggttgaggaacatttttaatgaccggaggagaaacagagaagaga
agaaataattgattttaaaaaagcagaatagaaaatttttgtgaagtcgtatgttaatttcaatgaagaggatcaacaggtgcaat
atttgacttggcacctagcatgtagaagtttctggttggggttgagcatggtaggcactgttgcttttacaactgtcattagagtc
ggaaacatattgtattcttgagggagcgttgctatggataaaaaaggcctatctactacttgatatttgggcattcagaactagtt
gtctaggaggaagaaaaggatttaaaatggtgagtattgtaggctttctttgccgtccaggatgcctgggctagttccctgaatt
gggatactggtggaggatttcctgaaattgatcatggccctgatatgttaggggataagaacattgaaggatcgaaggaagg
tgccggcgctaagttttgctagaaatgaacagttccattatggcttttgtcaaagatgggaatggaattggccccaacttctagg
catctccatccatcgtcaggtgaactaaagtaaggttacactggtagaatttttcattatttcatattaagtaaggtgaagccgtca
acaatcattgcgtgagaaggaaccaggaacaaaatctagaagatgtctactaaagtgctaatagataatctgcaaaatttagc
acggtaaggctagtgtagatctggttcaaattttaaattggtccaaaatgcgttaataaatgtcgggcctcgttttggtcccccga
aaggttgctaaataaagacttgacaaagaaacaggtgaaggagaagcccaaacatttgaacaaactacacctagcctaaac
aaagtgattgtttgcgaggaggaaaagcgagcatgcggagagagcctcaaacacaaaaaatggcctagtcttgtaatgagt
ctagccaaatcatgtaagctccgactttcaagagagatcaacagaaaacttcgtcaatccggataaatcaagaaaattatgata
atggaaaggaggctggacattctactgccgacgcaacccctggttttggagtcagtgagacaagtggaactaaagaagaat
atggatcaaaagagtttatccagttgacacctgatagactcactacatcagttttcagttcaagaacatttcaattcttgctgataa
agatagttgccgataaagataggcaaactgttacctaccaatcaaaggaggttgtttcaattgagttagaggtatcaaaggag

gagccagtatatatagagcaagttttgatgaagggagttgcctctatttgagaccaccaggtactcaagtgcttcccgtagttc
ctaggcattttatgatggatatgatagagaaatgtcttattgacaagaatatactagggctacagggataatagggttgggaag
gtgaggacttctttggttgctgtcaggaacttggaaacaaagggagaaaggggttggaatcaaaggttttgatttcgtttttgatt
tataaggaaataatgggtagtggatggagtcgaggataggaaagaggtttaccagttgcaccattgaatatgtaattagagac
actatcctcttgttagggaacacgactatcacaagcacgtaagggtgagtgaaagctccgacatggacgtggtttattcgggt
atgttggcacgaagccttcgtgtctaggtttggtgttgggttaagtgcaactccttaggaaggcaaataaacttgggacagattt
gatagttgtcggaagttgcacaatgatgatattttctttatccaaacgctacgaatgattgcacatatagtaactagagttatttctc
atttgagcttttatatgtaagaatcaaataaaatgattgatgaaatgcatgaaagctcaaatgagaaataactagttgtgagaatg
cacgggggaaaaatatattatattgattaaagtgttgtacaaccctatttagatacagtaattacataataataggtatctacttcc
cgatgtgggacactagacatgactaactacttaacaatccccctcaagccggtgcatataaatcatatgtatcgagcttgttac
agatgtaactaatacgagaaccagtaagagacttagtgaaaatatctgctagctaatcattcgactttacaaactttgtaacaat
atctcttgagagtatttttttctctaacaaagtgacagtcgatctcaatgtgtttagtcctttcatagaacaccggatttgacgcaata
tgaagagcagcttgattatcacacaccagttccatcttgctgatttctccgaacttcaactccttgagcaactgcttgatccaaac
tagaatcacacgttgccacaaccatggcccgatattcggcttcggcgctagatcgagcaactacattctgtttcttgctcttcca
agagactaaattacctcctactagaacacaatatccagacgtagaacgtcaatcagcaggtaatcctgcccaatcagcatctg
tgtacccaacaatctgctcgtggcctcgatcctcaaatcgtaacccttgcctggagctgactttatataccgaagaatgcgaa
caactgcatcccagtgactatcacagggagaaaccataaactaacttgcaacactcaccggaaaagaaatattaggtctagt
cactgtgtggtaatttaatttgccaaccaacctcctctatctcgtaggatctctaagatgctccccctgtccatgcagaagcttag
cattcggatccatagaagtgtcaactggtctacaacccatcattccagtctcctcaagaatgtctaaggcatatttccgctgtga
aataacaatacctgagctagactgagcgacctcaatacctagaaaatacttcaatctgcccagatccttagtctggaagtgctg
aaagagatgctgcttcagattagtaataccatcttgatcattgccaataataataatatcatcaacataccactcaactttggcatt
tctatctcaatttggctggaatatcctggacaatgcccaataacactgcgtctcttctcagtagctggaacaatggaggggcaa
atattaaacagaagaaatggtggaaagtagttcctgcttgtatctggtgggtcatgtggaaggaaaagaatgcagagtttttga
agataggcctagctcttagcctcttaccagaaaattaagcttaattgttttttgttatttcatttttggtgcaaagagagctataggg
aggatgtacattctttactagatttgctagaagaaatgtaatcgattagaataggcaaggcagttgcagatcttttggggtctgat
tgtggcttacactatctcctgtaaatatttttaatcttttatataatttgttaccattctaaaaaaaaacataaaccaccagataaatat
acagattaggagcagaatgtcgataaagcacagagtgatccgcttcactacgagtcatgccgaactcctgaataattatgctg
aacttaccaaaccaagctcgagggaactgtttcaaaccatatagtgacctgcgcaatcggcatacaagaccactagacttcc
cttaagcaacaaaaccaggtgattgctccatataaatttcttcctcaagatcaccgtggaggaaagcattcttagtgtctaactg
ataaagaggtcattgacgtacaacaaccatgaacaagaagagacaaccgatgctactttagccacgggagagagtgtcact
ataatcaagcccaaaaatctgagtgtatccttttgcaacaagacgagccttaagacgatcaacttggccatccgggctgacttt
gactgcataaacccaacgataaccaacaatagacttacttgaaggaagaggaacaagcttccaagtgccactcacatgtaaa

gcagacatctcctcaatcatagtttgtcgccatcctggatgagatagtgcctcacctgtagactttgggatagaaacaattgac
aaagatgatataaaagcataatgaggtgatgacagacgatgataacttaaatcgacataatgaggattaagattaagagtgga
tcatacacctttccgaagtgcaatcggtgtactaggaagagacaagtccgcagtaggagcagggtcaagtgtaggatgtga
atcagttgggcctgatgctgggtgcggacgacgatgatatgtcaagagtggtgttccggtggcggggaatctaggaggagc
cacactagactccccaacggttggaatgggtaagacttatgtggcggaaggtgaaggaggagctatagtaagctctttaaag
gtcggtataggtaagacctcagatatatcaaggtggtcagaagaggtaaagaaaggtttagactcaaaaaatgtgacgtcag
atgacataaagtaattacgaaaatcaagtgagtaacaacgatatccctttgaacacgagaataaccaaggaagacatacttg
agagtacgaggagctaacttatctttcctaggggctaaattatgaacgaaacaagagctccccaaaacacgaggaggaaca
gagtataagggtgactgggaaacaatactgcatacggaatctgattctggatgggagatgaaggcattcgattaaccaaata
acaagctgtgagaactgtatcgcctaaaaaacgcaacggaacatgagattcaaagagaagtgtgcgagcagtttcaatgat
gtgcctattctttctctctgcaaccccattttgctgaggggtataaggacaagaggtctgatgaataattccttgagaagtcataa
agtgctaaaattgagaggataactattctaaggcattatcactgcgaaaagtgcgaatagaaacaccaaattgatttttaatttca
tcacaaaaattctggaatatagaaaacaactcagaacgatctttcattaagaaaatccaagtacatcttgaatgatcatcaatga
aactatcaaactaacgaaatcccaaggttgagttgactctactatgaccctatatatcagaatgaactaaagaaaaaacagact
atgcatgactctcaatactacgaggaaaggaggctcaggtatgtttcccgagctgacatgactcacactctaatgtagataaa
ctaggcactatcttctgaagcttggatgtcctaaacatctgtgaattaggtccggaggatctgtaactagacatgccttggagg
aattgagtgggttaaggtagtaaaggccttctaattcaagtcctgttccaatcgtctgtccgtactgcggtcctgcataataaaa
gaatcattaataaaatatataccacaatggagggcacaagtcaaacgactaacagatgcaagattaaaaggacaaccaggg
acataaagaacggaatctagagtgacagagggtaggggattcgcttgtccaactccttttgcttcagtttgagacccgttggct
aaagtaacagtggaaagagactgtgaatacgcaatatttgacaaaagtgatttattaccagagatatgatcagaagcggttga
gtccacaacccattgtccaagagtactagactgggaaacacaagcaaaagaattaccagcaacaaaagcatcagtctgagc
aacagaggctacttgtggagatgtctgcttacttgctcgatactgaaggaacttattatactccccttccgataaagaaaatacc
cggttacctatagtctcggtctgagcaacataagcatttttgggtggacgaccatgtaaagaatagcacacgtcacgagtgtgt
ccaagtttatgacaataagagcacttgggtctagatcttccaaaacgacctcctcctcgtctattctccatagtttgagatgcccg
attgttcacttactgggatacgagaacagatgagtcaggtctctgtgatgagctcactgggtgacttggtgctgcagcaaggc
gaagtaatcgagagaataattcatcaactgtggggacagtcggactagccaaaatctggtcacgtactgaatcaaggtcatta
gggagtccatcaagtgtaagaactagaaacatcttctgtcgttgctcttgttgctttttaatactagcagaaactggcatcaacgt
ctcaaattcttccatgattgcctgtacttgtcccctagtaagtagacatatccaattcctgtttcttcaagcttgtcattcgcgatatt
acatcatagaaacgagatatgtcattagtgtataaattacgagccttttcccaaactaaataacatgtctggaatggacggaac
aagggcatcaacttggaatcaatagatcgccacaggatactacataactgagcatcgaccttcttcaaaagtgttttggccttttt
catcaccttcgctagccttttttgttaaatgatcttgaactccttgacctttacaacacaactcgacagacgaagcccaagctaag
tagtttgaacttctcattaaaggttctgaggtaatcataatagcagaacttccagaactcgtgtttttagacccaaatacatccact

cccaaagacattattggattgaaaagagatctagcaaattagcaccaaataaaacaaagaatcaactgtggttgcccaaaaa
ctgccggaaaactactgtagttgccggaaaatttttcaaagtgctcggaatcaaaaaataaaaatatgggcaggctcggaatg
gtagagcgatcagactaacctaaaggagtttttctgaaaaaattgacggaacgggctccatgcgctggtgcgtggagtagat
ctcgccggagaagactgtctccgatcggcgcgtggcggtgcgtgaggcggcttatgacggaggtgttcgctggggtttggt
cgccggaagttgggggaccttgtggtggtgttggtttttgcacaacaccgatggaattggttttgacgaaaaatagccctaaa
aggtcaccggaattgaagcacggcgacggctggttttttttttccccggatgttttctcactgccgctctgataccatgtgagaa
tgcacgggagaaaaatatattatattgattaaagtgttgtacaaccctatttatatacagtaattacataataataggtatctacttc
ccgatgtgggacactaaacatgactaactacttaacactagtaacctcatggttctcatcctacttcattgaccacttggccacat
ccttgggtgcctgcactgtagttgtagctgtaatgaagatagttttttttctttttctggatactcttatattgtgacaatttttctctattt
gctgttaatggatgaggttatgtgactctccggtggtgagaatgttaatgaacatcaagctcacatgtcatttcattttctgattga
tcttgctcttcactctttacgagtttaatgtgttagtccttccaagttctgtccatctatctttctggtgtgcttaacccatgtatattgg
accacactttgtattcatgctgattgcaacaaagcctgactgatcctgaactcctcctttatgccttaggtagaaattttgtgtgttt
agtgttacatgtttcgcttcaaaggaaaaagggagaaacttaaggtagaatcctgctccttgacctttggatccttgcacattga
agtggacagacatgtttgctttgctttgatgagttgttttagtagtcggtctaaacaactgctgatgtattctgctttattgtaagtgt
ctataatttttatctttccacaatttgctttcagctctttctgcatgtagagaaaataacagaagcttctatttgatcatgtaatattgac
tgcgcaagttcagttttaaacaactttggctatgcatatgcaagcaatgacctgaaataaatattatttttttatgcagggtctgtatg
gttttcttcagagatgaaagccttaagtgatgactgtgaacgatttgttagtttccttcccggtcacatttattcaagcaaaaatgg
tatgcccatacgaagctcatttctgagcttgtgcttcatttatgttgatagttgatcatgtttcctatacgatcagcgtacttttgctat
ttatttcagatttactttaggaccctgtcggaaacagtcttgaaacccttattgatggtgtaattgttatctcttgatcaaccaaagg
agtaattacatgtaattattacaaatttgcaataaaataacttttaggataaccagtggagcttaatgaatcttttaggatatttggg
atgctagagtgatgtacttttgataatgtcggttaatataaaatcctctgactttgtactgatgtactggctgagcagattttatatta
ctttctagtccctctgcaaataaaaaaattgtgagactgcaatataacaccatttttttaatgcatttacaatgtttaaacttgatgtag
cagtgaagaacatgtcgaccttaaacagaggttctatttgtcctagataaaggaacatcagcgtaatgaaacattacaggaga
gaagctctattgagtttttgttaatctagagggagcccgtaaatagaacaccaattcatctgttatatgacttctttttcattttggaa
cgttttaaaagtttgacaacatttttttgatctccgtacactaaacttttttgatgtattaaactaactatttccactactttaatattttcttc
cttaaacaactcatgttagcatcttaaactgtgtgtgttcaataccctcataaaaaaattaaacgagtatttttttatatttgcttatgcc
cttggagattgggatggggaagttcatcatttgaggtgaaaggtaaattcttttggatggacaaaaagtgaacctcgtctttggc
atggagggactatttaaatcgtcatcattaccaaagtcatcctttcaaatgtttactttcaagaactattcatgctatttctcaagtat
attatgggtgcaggaggactcagaagatggtacaacccaccatggtactcagaaaccattccttctactccatatgatcaccttt
gtcttacggaaagcttttgagaaggtcattctattttggatgtcgcttgtttctgagttgtacataatatttaggtgccactttgttata
ttttgaacttcatcaaaagcctttggttttttgaggacacatatccccttgactgactgggcgctgaatttccttgatgtattgtgctt
attttgattgtcctcttctttgtaatactcttgcctataaataaaccttctttatcaaaagaaaatgataaaatgttaataacactttgtg

atatatgttgaaggggagtcttggcataactggtaaagttgctgccatgtgaccaggaggtcacgggttcaagccgtggaaa
cagcctcttgcagaaatgtagggtaaggctgcatacaatcgacccttgtggtccgacccttccccggaccccgcgcataacg
ggagcttagtgcaccgggctgtccttttttttttgcatagactttacatgatattttatttcaatctttatcaattctttttttaccttcacatg
caaattatactaccgtatgtgaaatatgcaatagtttttcccgcaattttcatctttcatgtacctctctctactatccttgtattactac
tgatttggtgcattagatgttaattttattcccaacctttactttatgcaggctgtagtcaagcgacttatgacggatgtaccatttg
gtgtgcttctctcaggtggactagattcttcacttgttgctgcagtggccaaccgttatttggctgatactgaagctgcgcgaca
atggggatcacagttgcatacctttttgcgtaggcttgaaggtggtgatgctccctttttgtaaacttgctctgattagggaattgct
agctgtatcatcccaattcacatggaagttctagaccattattgctgtttctttttccatatatagggatttttctgaaaatagtaaaaa
ggaaatggaatttctcattattaaagataccaaatgccttttttgggaaatgatcttacagttgaatctgaaatttccttttgacattgt
gattaattctgatatgaatttggtccatcctggctttccttctcttgattgtagatttttttttctcttttttgcaattatatgcctttgtatttca
tatctcttattatgctattattttattatgcatttttatggtactaatatatcggctcctgttgctttttttgagccgagattttgtttatttct
gctatcacgtcctcctgaaaaagtgctactatcttgtattcatgcgggagtttgaaatttgcaagtgtataactttacaaaatgatt
cgaactgatcacagttcattgctaataaacttttataaaaagcaggtattgttgtgatataatgtgacacttaaataaatttaaacct
acatcctttcgaaatctctaatagcttcactaatatttcttgtgctaaattcttccaacacctcttatcgatgccaaatttggcagacc
ttagtgcaattgaaagtgtttagtgttctttatgcagtaggtatgttattgtccaaaatgacagaaataaagttagagatttgttgaa
aagccacttggtgtgattgagcagttcggagatgagtgatttatccatctttttatacttttagtgttttgttttctttttatattgttttctc
ttttgcttttgtcattgtaattaaggttgtcttttgtttgactttagggttctcctgatctgaaagctgccagagaggtggcagactac
cttggaactcgtcaccatgagtttcactttactgtgcaggtaactttcttcataaagacatcctatgctgattttccttataggagtat
aactgcttaagtcaaattggctatctacttctttctattgctacatcaggaaggaattgatgcactagatgaagtcatttatcatgtt
gaaacatatgatgtgaccactatcagagccagtacaccaatgtttctcatgtctcggaagataaagtccttgggtgtgaaaatg
gttctatctggtgaaggttctgatgaaatttttggcggttatttatatttccacaaggcacccaacaantttacacaaaaatgacac
aagttatgcagaaaaaatagtcctcaatgtcatgggagaccagggttcaaatctgaggttaaaaaaaatactaggtgaactctt
ctaatccgtttaagccttggtagatagagttaactagtatatgagctagttagagctagcaggtacctggtagattagtgcaggt
gcacacgagctgactcaaaaccaccattattaaaaaataagaaagttttcaatgttgttccaccgtgaattcatgatgtgccgac
tttcctgtgtttatctctggatagatgaagagtgtttttggatcttgattaattctgtttggccccttttgaggttctgcaagctatttcta
gactcaaacttgctgcgatctatgttaggtctagagaatatctgccaaataaaacaatggaaggtacactcaagtattttatctcc
atattacaagtcagtgttagttgaatgggtctgatatatgggacagaaaatggcttcatacccataacctcattaaaatgttgctg
atgtgctgatctcatctgtacatctagtataatcctaattacaaattaatgcatctctttgcggtgactatagtatgctgaagaacttt
tcttgaaacattgcagatcagacctgatctcggaagaatagaaaagtgggttctacgcaatgcttttgacgatgatcagaatcc
ttatctgccaaaggtttgtttgttttcttgtatcaggtccaaaatcaaaatctttgtttattcatttgcataaacaggcagtagactcc
caatacattgtgtacacttatgcacaaatgtatgagatgtgtattatatgtgtcacatataagggtatttccacatggtgtttattgat
ctagagaaagcgtacgacagggttcctagggaggtcctatggagatgcctagaggttaaaggggtcccggttgactgcatt

agggtgattaaagacatgtatgatggagctaagactcgaattaggacagtaggaggcaactccgaccattttccggttgttac
ggggttgcatcaagggtctgcgttcaacccttcctatttgccttggtgatggatgctataaccgcatcatattcaaggggaggt
gccatggtgcatgttatttgctgatgacatagtcctaattgacgagacacgacgcggcgtcaacgagaggctagaggtttgg
agacatgcccttgagtctaaaggtttcaggctgagcaggacgaagacggaatatctcgagtgcaannnnnnnnnnnnnnn
nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnatcgtatatgggtagggtggatgaagtggaggttagcaacgggagtcttgtgt
gacaagaaagtgtcaccgttactaantctcgagtgcaactttggggccgagccgatggaagcatgagtggaagtgaggctc
gactcacaagtcatccctaagaggggtagtttcaagtaccttgggtcagttattcaggggaccggggagatcgacgaggat
gtcacacatcgtataggggtggggtggatgaagtggnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnataggggtagggtggatgaagtggaggttagcaacggga
gtcttgtgtgacaagaaagtgtcaccgttactaaaaggtaagttttacagagcagtggttaggcctgctatgttgcatgggacc
gagtgttggccggttaaaaattcacacatctagaagatgaaagtagcagagatgaggatgctgaggtggatgtgcgggcat
acaaggatggacaagattaggaatgaagttattcgagagaaggtnttgagccgagggtctcctggaaacagcctctctgcc
cctcggggtaggggtaaggtctgcgtacatactaccctccccagaccccattggtgggattatactgggatgttgttgttgttgt
tgttgttgttgtacatataagggtattatatgtacacactcctcccacctttcacttatatattcacgtaaaacacatgcatgtgtaaa
acctatatatgtgtgtgtgatatatataataaaatgatgtttgaaaagacattatgatcaagtagttgatcttcatctgctttccgtttt
tagcatatcttgtataggcagaaggaacagttcagtgatggagttggctacagttggattgatggtttgaaggatcacgcaag
cagactggtgagctttttagttgttttctcttccctcctcttccattctttatcccttcctttgtggttttgttgaacacatctcgtatattt
ggtccaggtttctgattctatgttagcgaatgcaagtttcgtttacccgcataacacacccacgacaaaggaaggatactactat
agaactatttttgagcgatatttccccaaggtgggtcttagatagtcttcttttccttgttattcatgttcaatttttgatattttgtccca
aacaatgttttcttttttcttccttctgttaacaaggtcgcttctatcttcatatttgttgataaaggtaatcacattgataactattatttg
gagcagaatgctgcgagggaaacagttccaggtggtccaagtgtggcatgcagcactgcaaaagcagtagaatgggacg
cagcttggtccaagaatctagatccatctggacgagctgcactcggtgttcatgcagctgcttatgaggatgcatcagaggtt
aaaaccacagtcgcaacagataccctcagaaacttgaagttgataaagctgcagtagctgtttga

SEQ ID NO:10 - NtASN3-S, trình tự axit amin suy luận

MCGILAVFGCIDNSQAKRSRIIELSRRLRHRGPDWSGLHSHDDCYLAHQRLAI
VDPTSGDQPLYNEDKTIVVAVNGEIYNHRDLREKLKSHQFRTGSDCEVIAHLY
EDYGEDFVHMLDGMFSFVLLDTRDKSFIAARDAIGITPLYMGWGLDGSVWFS
SEMKALSDDCERFVSFLPGHIYSSKNGGLRRWYNPPWYSETIPSTPYDHLVLR
KAFEKAVVKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVAAVANRYLADTEAARQWGSQL
HTFCVGLKGSPDLKAAREVADYLGTRHHEFHFTVQEGIDALDEVIYHVETYD

VTTIRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVLSGEGSDEIFGGYLYFHKAPNKEEFHQE
TCRKIKALHLYDCLRANKSTSAWGVEARVPFLDKEFVNVAMNMDPESKMIRP
DLGRIEKWVLRNAFDDDQNPYLPKHILYRQKEQFSDGVGYSWIDGLKDHASR
LVSDSMLANASFVYPHNTPTTKEGYYYRTIFERYFPKNAARETVPGGPSVACS
TAKAVEWDAAWSKNLDPSGRAALGVHAAAYEDASEVKTTVATDTPQKLEV
DKAAVAV

SEQ ID NO:11 - NtASN3-T, trình tự ADN hệ gen

atgtgtggaatactagcagttttcggttgcattgataattctcaggccaagcgttcccgaatcatcgaactttctagaaggtaga
attttttttaaaaaaaa
aattgcattccaatttttctacagcattcttattctttggggtgacaatggtatgcatgt
gttttggatttgctattcgtggacttgttcgctttctcgtggtcttcgatttgtttttgt
taatttataatcagtgtttttatatggatttctttttttgaatctctcaaatatatgacat
ttgatttccacgagaaaatttggcatttttatggttcttatgatatgcggttaacccttc
gccttgcatcgcttcagcgctttaaaagacgaaatgatggctattagtaatactgctaga
gtggttattgaattacattaaataacagattgctagtagatcaaattcagaatgacagtg
aaatatctctggaaacttgaatccccgttcaattcgctggtaaaacctggcaaaaaaata
gctttatctcaaaggagagtatgtcactgtgaaattggtggtatgtgttgtttaagcttt
aaggcatgatatgctgctcttaggtgatgtcaggatgataataccatccttttcacacta
gactcagctttgaagcactttcatctcagttaatcggtggaggaaaatctagtttgcttt
gggcataatataccaaatgtcttccttttgttttctagtgttgtttctcaagaattgaaa
aaccaacctacaatatagtgatataattaactagttagctcttcctgtttttctgaaaat
ttccaataattgagaagcgtttacaggtcaattagtaaagggagaacggaacatttttt
cctctaaagaacttctctttttccatacagaatgactttctatacaaggcctaagtctgc
tttagtgtctgcgattaagcatcttctgggaaacttcacacttgaaagaagtagaactag
gagggggcaggtctagcaagataattgcttcagtcatttctcataaaaaaacattgtttc
attcattatgtgcattcatatagagttggttaagctgctaagctgagctaatagtatgat
agctatgaatctcgacaaagtaggttgcttcttagggctttattctttggctccgtaaag
aatttcttttggaagggcttcagagtgggtaggactgttctgatgataagctgtaacacc
aacgaaacaagcctttgtagctgtggaagtccgaggggtggtggtggtggtggtgt
gagagttagagtggtggaggagaggggaggagtgaagagaagtttatattttaaagaata
gggccttgagaacttttagtagtgagcngggggggggggggggcagaggggaggagtgaa

gagaagtatatattttaaagaatagggccttgagaacttatagtagtaagcatgcattat
tattattgttgttattattattattattattatttttattattatgtaagatgtaattac
ttagctaatgaggtttttccaactatttccaaattgtgaaatgtgttgaaagcataatta
agtatataaaagcgtgttctttctaatatctttagctttaagaggagataatcacaaaat
ttatcttgataatatagcagacaatttttcctagttcaaatctcacgtcacccttcataa
aaaatttccacgtgcttggcttgcatgttaggggacgtcttgacataattaaacaaatat
aattgtccctctctaacagcttaagcttttagatgaggcggtcaacaattcaacaatttg
catttgtttgataagaagttatattaaaagaacacttaaaaggtgtcagtatgtgcacaa
actcaaggtgtagactaactagaagtcaattcaaattttctgcttgttctctctgtttta
cttcttttgcactatagaaattgcatttccagcattcccgaaagctgcttcctttgcata
tagacatcacatttccagcgtgtctgataagcgttcttgcttattcctgtccctctactt
ggttgattttcctctcacttagttcactgtcttcttgcacgcattatcaaattgtgttct
caattctcttgccttcttttcatctgaccccacaaaatacctcccaaaaagcctttagtt
tctgcttttccgagtctgaaattatctgcttattactgcctttcaagtattctgatacgt
tgaccattgttttccccagtagtaatgcattgttctctgtccaatctctatttttttttt
tgtgaaccactattctttgttgcttctgtttcgtcatcctcagttccccatcttctcaat
ttgattttcctcatttaaaaagcgtgtgccccttttcttgtgctaccctctcaaaaatca
gttgctgtcatctcgtttgatctgtcatgaacccagttgatgccacatgtttagttcttt
acctctggacaacttttacttcctgagaaccacaatttcctttccttaagaaattcttag
aaattggttatgtaaactgtaaagggaaaatttcccagcaatcaccatttggcctctacg
tggcttgcttttcaacttaccgacacgtgttcatccccttttaacaaatgctgaccatta
tcttctgcttgttggggcatgcttcttacccatggtgttaaccctgatctttcgtatcac
atttttcaactcttaattctcatcttataaagtgcatatccttgcctctttagttgatct
tgggttgggctgttaatccaaattccatgggctttgctttgaagtatgataagcattagc
tttactacagtagcatattctacgttgctacagacatgaaattttcctgatttgtctttg
atgtgatgtctggcaagtgtagattacgccacagaggacctgactggagtggattgcata
gccatgatgactgttatcttgctcatcaacggttggcaatagtagacccaacttctggag
atcagccactttacaatgaggacaagaccattgttgtcgcggtagggaaatatttattat
atcatttcttagatagttaagtattttaccagtacatggactttggacaatatttgtgcg
ttttgatcttctatagcacaaacttttctcgtaggataaatttcctctactttgagtgaa
tcttaacaggaaaatcggaataaacaatttgtgatttcgaaatttttagttcttacatat
ttgaaacatgtgcggtgaagtaactaggcgcttgactaggtgaatacggagaatttcctc

tactgttatcgatattttctcagttcatttgaaagatctctgggtcgtctagcagtacaa
ctatttaggcaacttaatcaaatccccttcccatgagtttcactttcttgacttgtttta
tattttgacattttgcaatgccgaaaataaattgtttttccattttatgacctttaaaat
gttgaggtgaagggctaggcggtactttaatcgacttatcggcaacaatgtattagatac
agagcacaaacttgtttgggtgcctaaattgatatttttgaaaagtcgatggagtaaatg
gaaatatggattagcaaaaatattgaaatagtagatctaaacaatggatgactgaattta
gaggaggacctttttcttctttccttgttgaagtggttataagagaattattggaagaaaa
tgtaagctttagggtagtgttgcaccataacagtcatgctttccctcaattattagtgta
gctgatgaatgcttttggaaaggtggctgatttttgctgcgtattttatgtctttcatc
atctcaaaatttgttgtgttttaacagtgcttggaaggcctagagtcttctgaaaaaagt
aggctgagaaaacatgagtaagcaaatttcttcctgctggcaattaatctttgtatatga
ggtgaagccacataatctaacatggtattagacatataaatattatttttgacatagagc
agacagaaatcttgggtctagttgctatctcccttcctaataagatgccctcattgctat
atcccaaaacagattcaccctagaacgaataaatctctccttgcagccacatatatatta
ataagtagtgtaacactaaaacatttgtgcttctgcaaagtctgttgaagtgggcgatta
agtaataaattgtgtgagtttgactgaagagaaagtaataaattgtgtgagcttctcaca
ttttcatgataatgtcaattcatctgattgaacttttgaaggacatctccttttctaaa
agtttttgttcacttcctgaaaatggttgctttcccaaatgtattctcctgtattttcct
tgtgctttatgttgaccaggatgactctggccttccctttttcaaatggtgacttcatta
ccttttaacaaaagatcaaatagcctttgtatgcttgaaatcgaagcagaatttagggct
caatttctctaggagatgtgtagcagtaacataacacgtggttaaagcaacttttaagca
ctgccactgtcaaatttgatatgacgctattactatttagagtgtcaaatagtatttctt
ttgactaccaatttttcaatatctttttttataccttttttctttgactgtgacttatagt
atattttatgtagtttcagaatatatattttagtttttaaagaattgatgtctgaaagta
cagccaattagatggtttcacccttgtacttcaaatcttataagttgtttaggttaaagg
aataatatgcatgattacattgtttggattgaaattcagaagatcaaatgtgcaggcaaa
aagcttgcggaagatataattctgtcattttgttgtttagattaacttcccctgtcaaat
agctaaaactaattcatactttctcaggatccttcttgattggactactctgatcttctt
ccatatattgatatatcatattccttttgcttttaggttaacggggagatatataaccat
agagaattacgggaaaagctgaagtcccaccagtttcgaactggcagtgactgtgaagtt
attgcacatcttgtaagtactttcagaatatattcaaataaatatacatgacttctcagt
ttctgtgcgaagaatgatttcaaaataccatgactcaaatttctcatcaaaagagaaaaa

ggtggattgtagtaagagaatgagatttttttgtcataatttctttcttatggtatttgaa
ctccacgatctacctatcgcagtatgaagactttggagaagacttcgttcacatgttgga
tggaatgttctcctttgtgcttcttaacacccgtgataaaagtttcattgctgctcggga
tgcaattggcattacgccccttttatatgggatggggtcttgatggtatgtaatttttcca
tttcataatttttggtatattgccctttttaataaatagcctgtgagttatgtgaagttcc
tttgttgtttccttgtttttttatttgcctgatgcatctttgttgttttgcctactataat
gctggtttcatgctgttgttacaaacaaatgatgtataatagtgaacagtacatgttttc
ttgccgctgtagatcaacaatgtaccaagaacatctgtcttaagctagttcaacctaatc
ttcagttatctatcattccagcgaataacacatgtagagttaaccggacattacctaagg
ccagctatacaacattgtgaggtgtgactaaggaactctgaacactgtttggagaaatgg
aaagcaacatatccgtgtttgttttgaagtactataaggaggcagcaaccttgctggatt
tatcacttgacagcaaatgtcaatggttgaggaacatttttttatggctggaggagaaaca
gagaagagaaaaaataattgattttaaaaaacagaggagaaaattttgtgaagtcgtatg
ttaatttcaatggctggaggtgcaatatttgacttggcaactagcgtgtagaagtttctg
gttggggttgagcatggaagacactgttgcttttacaactgtcattagagtcggaaacat
attgtattcttgagggagcgttgcaatggataaaaaagtcctacctactacttgatattt
gggcattcagaactggttgtctaaagctgagaaggaagaaaaggatttaaaatggtgagt
attgtaggctttcttttctgtccagggtgcctggactagttccctgaattgggatactgg
tggaggatttcctgaaattgatcatggccaaagagatatgtcaggggataagaacattga
aggatcaaaggaaggtgctgcgctaagttttgctagaaatgaacagttccactatggctt
ttgtcaaagatgggaattgaattggccccaacttctgggcatctccatccatcgtcaggt
gaacaaaagtaaggttacaatggtagaatttttcattatttcaaacaagtaaggtgaagt
cgtcagcaatcattgcctgagaaggaaccaggaacaaaatctagaagatgtctgctaaag
tgctaatagataatctgccaaatttagcacggtaaggctagtgcagatctggttcaaatt
ttaaattggtccaaaatgctttaataaatgtcggacctcgttttggtcccccaaaaggtt
gctatataaagacttgacaaagaaacaggtgaaggagaagcccaaacaattgaacaaact
acacctagcctaaagaaagtggttgatagtttggtcggaggaggaagagcgagcctgcgg
agagagcctcaaacataaaaaatgacctagtcttgtaatgagtctggccaaatcaagtaa
gctctgactttcaagagagatcaacagaaaacttcgtcagtctagataaatcaagaaaat
tatgataatgaaaaggaggctggacattctactgccgaccaaccctggttttggtgtcag
tgagacaagtggaactaaagaagaatatggatcaaaagagtttatccggttgacacctga
taaactcactacatcagttttcagttcaaaaacatttcaattcttgctgataaagacagg

caaactgtcacctaccaatcaaaggaggttgtttcaattgagttagaggtatcaaaggag
gcggcagtatatatggagcaagttttgatgaagggagttgcttctattggagaccaccag
gtactcaagtgcttcccgtagttcctaggcattttataattgatatgacagagaaatgtc
ttattgacaagaatagactaggactacagggataatagtgttgggaaggtgaggacttct
ttggttgctgtcaggaacttggaaacaaagggagaaaggggttggaatcaaaggttttga
tttcatttttgatttatgaggaaataatgggtagtggatggagtcgaggatgggaaagag
gtttaccaattgcaccattgaatatgtaattagagacactatcctcttatttgggaacac
gactagggtgagggaacgctccgacagggatgtggtttattcgggtatgttggcacgaag
cttttgtgtctaggtttggtgttggcttaagtgcaacaccttaggaagacaaacaaactt
aggacagatttgatagttgtcggaaattgcacagtgatgatattttcttcttccaaacgt
tgggaatgattgcacatgtagtaactagagttatttctcatttaagcttttatatgtaag
aatcaaataaaataattgatgaaatgcatgaaagcaactgtcttacgcctgaatgctttt
aaaaggcatgctttacaaagtttttggtacatctatctgacatgacacactaacattcac
tcttatatgtgtacatatttaactaagtccaagcctaactatctaactggagatatcaaa
gttcttagctctttaaagctttcttaactttaggaagatcctgcagtgttgttttttat
aaccgtggtatccaggctagcttgcacacatctcgactaattccaccgggtgcttgctat
ctcccaccaacacagattacctggtaactcatgggaagaaatcacctattgttttgagtc
tgctggcatttgaagttttggactactaacctcatggttctcatcccacttcattgacca
cttggccacatccttgggtgcctgcactgtagctgtaacgaagatagttttttttccgg
gatactcttatattgtgataatttttttgtattcgctgttaatggatgaggttatgtgac
tctccggtggtgagagtgttaatgaacatcaagctcatatgtcatttcattttctgattg
atcttgctcttcactctttacgagtttaatgtgttagtccttcccagttttttttaagag
cgagaagcgcaaaaaagcgacaagggctcgcctcgcttcaaaagcgaagcgcaaagcgaa
gcgcacactttattaaagtgaagcgcaattcttaaaaaacataatgtaaaccttgcaaag
acacaatataaaattataaataatcaaaaagttcaaattgtcaaaatcaaagctactaaa
ttactagaatcaacctcttattcttctactcttcttgttcttcttcaagattgtcaaaat
cttgaattcctctattatcttcatattgctcgtcatcttcctcctcccctcctcttcct
cttcatgatcactttcatcttcatcaattagggatagggatcgacttgtagtagccacac
tttttcccttcctaatcgagcttgaacttgaagtattccccccttaaaccataaggattct
ccccaactccactagcaaccgcaacatcaccccaagtgaaattagaatcgccttcaaata
cttcttcatcttcacaattttcggggactccggttagccactcattagcctcatcaatat
tgtccaaaagaattggatcaattagattgcggtggttgtagcgacgcctcaatgctctat

tgtattttatgaacactagattatggaggcgcttcaaggttagtcgattcctcttctttg
tatgaatctgcaaacaagatgtgtcaactaattagtaggagttgggacaattgagatata
atttactttatctcaaaacacgaaataattctttttatttctcacgtgttcaaaaacgct
ccagttcctttcacatccggatgagctacaagttaaacttagaactctgatggcgaaagt
ctgtaaattcggagtctctacaccatattggtcccaccactcaactatagaagtgaaaaa
aaaaaattcaagagttaataagtataaaaaatacattaaagttagagctataaaatatag
aagcacttggtcacctggcgatttcgtctttctttgtttaatagcaagtcggagcttaaa
aagtccctcagctgccttgtaaatagcaagctgatctactatcttttcttgcatgtcttc
atctggggtcaacttgataacaacctcatggaatcctgtccacacttctctagccaatga
attattctcatgctgatcataaaagagtgacgggttcagaataagtccagctgcatgcaa
aggtctatgaagttgctcactccatcttgcatcaatgatctgaaagacctttgcatattt
ctgctcatcagtgaatgatgcttgaatagcctccttggccctatccatagcttcatagag
gtagcccattggtggtttttgctccccatccaccaaacggagtactttaaccaaagggcc
accaattttaagagcatgaaggacattattccaaaaagaataagaaagaataatgcgtgc
aacatctttccctgcactttcctttgcaaatttactcttgctccattcctctgaagtgaa
caactttctcaaattggatttttgcaagtggatactatgtaaagtcaagaaagcagtggc
gaaccttgtcttgcccggtttcaccaaatttttttgtccggtgaatcttctcatcatatt
caataacaagggccgctgagaaatataagaatgtaccctaacgccctggccaaaaactgt
agagaagggtttttccttgaaaatgtccccgaagattaagttgatacaatgagccgcaca
tggagtccaatagacattcttgtacgctccttccaccatgccacccgctttcacattttc
actcgcattatcagtgaccacttgaacaactttgcttgggccaatcttttcaatggtgtt
ctgaaacaaggtgaacattttgatgtggtcagtggatgagtcgctagcatcaatggactc
aagaaacaaacttcccttgggagaattcaccaacacgttaataatcattttcccagttct
tgccgtccacttatccatcataatggagcagccatacttgttccacgcaactttatgttc
ctccacaattttattagtctcctccacttccttatttagataaggacctctgatttcatg
ataagtgggaggcttcattccaggtccgtattgaccaacggcctcaataaagtctccaaa
agtgtcagtatagttgacacaattgaaggggagcccagcatcatagacccatcgtgcaaa
agctctaactgcacgatccctcaaaatgtccttagcaatttttgtacatcttttccacc
gctctttccttccggcttctttgggaaatagcaatctataggacctttagtcctactcgt
acccgtcgatccatggcttgaagagattgcatctcttccccgttttgttggaagtgacaa
ttcttcaatatcatcatcaccatcatcatcaagattggtcaccaatggttgatgactcat
ttgatttttttgctccttcttcttctcaacaaaattctttatttcatccctcacctccgg

tggacatttcggacaacttgtgacgtttctatcgccaccaataagatggaatttaaagcg
ataaattccacccgttgtaatcttgttacaaaacttgcatacaatatttgtattcttctc
attaactctatcgccatatcgccaagccgggtctttatctttcgatctttgagacatttt
gaaatccctattaagatataagaaaatacataatcaaataaactgaaaatacatataata
tatataataattaattttataaaccgaaatacacattaaaaaaatcaaataaactaaaat
ataacatatataatttttctaaattgaaatacatataaaattaatcaaataaactgaaaac
ataacatatatataataattaattttatatactgaaaaatgcattaagaaaatcaaataa
actgaaaaatataacatatataaataataattaattttatatactgaaataaaaatcaaa
taaactaaaatataacatatatatataataattaattttctaaaatgaaatacatataaa
attaatcaaataaactgaaaatataacatatataaataataattaatattatatactgaa
atatacattaaaaaatcaaataaactgaaaaatataacatatataaataataattaattt
tatatgctgaaatatacattaaaaaaatcaaataaactgaaaaatataacatatataaat
aataattaattttataaactaaaatacatattaaaagtaataaataagaagaataaaggg
gggaaaaaaacaaaatgggttagagataaaaggaagaagaagacgctgaagtctgaacag
tgcaaactggactgtcagagtctcagagataaacgaagaagaagaaggaagaaagaagga
aaaagaaagaaaaaaaagcagaatctgacgggaccaagaagaagaaagaaagaagaaaga
aaaaaaagagaagaagaaaattacctggactggtcagcaatgtcaatgaagttgaaccct
aggctttggtcgacctcgatcgaagaagagagaagaagaaatggccatttttttgtcaatt
tagggtctgttttgtataatagaaaaacagacccaaagttttttttaaaaaaaaaagggc
ctgcgctttttttaacaaaagcgatcgcttcgtcgcttcctccgttgaagcgtgcgcttcc
ctcggtcgagtcgcctcaggcagctagaagcgacactgagtcgcgtcgcgtcgcttcgcg
ctttaagcgcgaagcgatcgcttttctaaacactggtccttccaagttctgtccatcttt
ctggtgtgcttaacccatgtatattggaccacactttgtattcatgctgattgcaacaaa
gcctgactgatcctgaactcctccttttgccttgggtagaattatttttgtgtttttag
tgttacatatttcaatttaaaggaaaaagggagaagcttaaggtagaatcctgctccttg
acctttggatccttacacattgaagtggacagacatgtttgctttgctttgctttgatga
gttgttttagtagtcagtctaagcaactgctgatgtattctgctttattgtaagtgtcta
taatttttatctttccacaatttgctttcagctctttctgcatataagagaaaataacag
aagcttctattcgatcatgtaatattgactgcacaagtgcatatttaaacaactttggct
atgcgtatgcaagcaataataaatattacttttttatgcagggtctgtatggttttcttca
gagatgaaagccttaagtgatgactgtgaacgatttgttagtttccttcccggtcatatt
tattcaagcaaaaatggtatgcccatacgaagctcatttctgagcttgcgcttcatttat

gatcagcgtacttttcctatttatttcagatttactttaggaccctgttggaaacagtct
tgaacccttattgatggtgtaattattatctcttgatcaaccaaaggagtaattacatgt
aattattacaaatttgcaacaaaatcttttaggataatcagtggagcttcatgaatcttt
taggatagttgggatgctagagtgatgtacttttgataatgtcggttaacataaatcctc
tgactttgtactgatgtactggctgagcagattttatattactttctaatccctctacaa
ataaaaaaattgtgagactgcaatataacaccatttttttaatgcatttacaatgtttaa
acttgatttagcaacgtagaacatgtcgaccttaaacagaggttctatttgtcctagata
aaggaagatcagcataatgaaacattacaggagaggagctctattgagtttttgttaatc
tagagggagcccgtaaatagtacaccaattcatctcttatatgacttctttttcattttg
gaacgttttaaaagtttgactacatttttgatctccgtacactaaacttttgatgtat
taaactaactatttccactactttaatattttcttccttaaacaactcctgttagcatct
taaactctgtgtgttcaataccctcatataaaattatacgagtatttttttttatatttgc
ttatgtccttggagtttgggatggggaagctcatcatttgaggcgaaaggtaaattcttt
tgaatggacaaaaagtgaacctcggtctttggcatggagggactatttaagtcgccatca
ttaccaaagtcatcctttcaagtgtttgctttcaagaactattcatgctatgtctcaagt
atattatgtgtgcaggaggactcagaagatggtacaacccaccatggtactcagaaacca
ttccttctactccatatgatcaccttgtcttacggaaagcttttgagaaggtcattctat
tttggaagtcgcttgtttctgagttgtatataatatttaggtgccactttgttatatttt
aaacttcatcaaaagcctttggattctttgaggacacatatccccttgactgactgggag
ctgaatttccttgatgtatagtgcttattttgattgtcctctcctttgtaatactcttgc
ctataaataaaccttccttatcaaaagaaaatgataaaatgttaaaaatactttgtgata
gatgttgactatagactttaaatgatattttatctcaatctttatcaattctttttacc
ttcacatgcaaattatactacagtatgtgaaatatgcaatagtttgtcctgcaattttca
tctttcatgtacctctctctactatccgtgtattactactgatttgatgcattaaatgct
aattttattcccaacctttacttttatgcaggctgtagtcaagcgacttatgacggatgta
ccatttggtgtgcttctctcaggcggactagattcttcacttgttgctgcagtggccaac
cgctatttggctgatactgaagctgcgcgacaatggggatcacagttgcatacctttgc
gtaggcttgaaggtggtgatgctccttttgtaaacttgctctgatttgggaattgctag
ctgtatcatcccaatttacatggaagttctagaccattattgctgtttctttttccatata
tagggattttctgaaaatagtaaaaaggaaatggaatttctctttattaaagataccgaa
tgccttttgggaaatgatcttacagttctgaatcgaaaatttccttttgacattgtgat
taattctgatatgaatttggtccatcctggctttccttctcttgattgtagattttcctt

ctcttgttacaattatatgcctgtctttttgtcttactctctgagacaggcaatgtaact
ccagttgcaaggtttggtaatattgacttgtttatttctgttatcacatcctcctgaaaa
agtgctactagcttgtattcatgcgggaatttgaaattttcaagtgtatagctttacaaa
atgatcagaactgatcacagtcattgctctaaataaaattttctaaaaagcaggtattgt
tgtgatataatgtgacacttaaataaatttaaacctacatcctttcgaaatctgtaatag
ctccactaatatttcttgtgctaaactattccaacacctcttatcgatgccaattttgac
agaccttagtgcacttaaaagtgtttagtgttctttatgcagtaggtatgttattgtcca
aaatgacagaaataaagttagagatttgttgaaagccacttggtgtgattgagcagttcg
gagatgagtgatttatccattttatatacttgtagtgttttgttttctttgcttttgtc
attgtaattaaggttgtcttttgtttgacattagggttctcctgatctgaaagctgccag
agaggtggcagactaccttggaacccgtcaccatgagtttcactttacagtgcaggtaac
tttccacaaagacatcctaccatgtgaccaggaggtcacgggtttgagctgtggaaacaa
ccttttgcagaaatgcagcgtaaggttgcgtacaatagacccttgtggtccggcccttcc
ccgaccccgcacatagcgggagcttagtgcaccgggctgcccatcctaagctgattttcc
ttataggagtataaccgcttaagtcaaattggctatctacttctttctattgctacatca
ggaaggaattgatgcactagatgaagtcatttatcatgttgaaacatatgatgtgaccac
tatcagagccagtacaccaatgtttctcatgtctcggaagataaagtctttgggtgtgaa
aatggttctatctggtgaaggttctgatgaaatttttggcggttatttatatttccacaa
gggacccaacaaagaggagtttcaccaagaaacttgtagaaaggtggatctcattgtcat
ttcttcagtcattcaggattattggaagtaactgtatttttactagaatacttctttgaa
ctatttctagctctgatggacgctttgatgttaatccagattaaagcacttcatctttat
gattgcttgagggccaacaaatctacttcagcttggggtgttgaagctcgtgtacctttc
ttggataaagaatttatcaatgttgcaatgaacattgatccagagtggaaaatggtaacc
tacagtgcttccgtctcatttctccacccccccacccccccaaaaaaaagaacagaaaaga
attgaaaagagagattcttttcttccttcaaggaagaaggggtaacaaaagaatagctg
caagttatgcagaaaaaatagtcttccatgtcatgggagaccagggttcaaatctgattg
ttaaaaaaaacactaggtgaactcttctaatctgtttaagccttggtggacatagttaac
tagtatatgagctagttagagctgactcgaaaccaccattattcaaaaaattaagaaagt
cttcaatgttgttccaccgtgaattcatgatgtgtcgactttcatgtgtttatctctgga
tagatgaagagttttttggatcttgattaattctgtttggccccttgaggttctgcac
gctatttctagactcaaacttgctgcgacctatgttaggtctagagaatatctgcctaat
aaaacaatggaagttacattcaagtattttacctccatattacaagtcagtgttagttaa

atgggtctgatatatgggatagaaaatggcttcatacccataacctcgttaaaatgttgc
tgatgtgctgatctcatctgtacatctagtataatcctaattacaaattaatgcatctct
ttgcggtgactatagtatgctgaagaacctgtcttgaaacattgcagatcagacctgatc
tcggaagaatagaaaagtgggttctacgcaatgcttttgacgatgatcagaatccttatc
tgccaaaggtttgtttgttttcttgtatcaggtccaataatcataatctttgtttattca
tttgcataaaaggcagtagactcccaatacattgtgtacgcttatgcacaaatgtatgag
atgtgtattatatgtgtcacatataagggtattatatgtacacactcctcccaccttcca
catatattatgtgtgtgtgtgtgtgtataatgaaatgatgtttgaaaagacattatga
tcaagtagttgatcctcatctgctttctgtttttagcatatcttgtataggcagaaggaa
cagttcagtgatggagttggctacagttggattgatggcttgaaggatcacgcaagcagt
ctggtgagctctttagttgttttctcttccctcctcttccattctttatcccttccttttt
gtggttttgttgaacacatctcatatacttggtccaggtttctgattctatgttagcgaa
tgcaagttttgtttacccgcataacacacccacgacaaaggaaggatactattatagaac
tatttttgagcgatatttccccaaggtgggtcttacatagtcttctttttccttgttattc
atgttcagtttatgatattttgtcccaaacaatgttttctttttcttccttttttctgtta
acaagatcgcttctatcttcgtatttgttgataaagttaatcacattgttaactattatt
tggagcagaatgctgcgagggaaacagttccaggtggtccaagtgtggcatgcagcactg
caaaagcagtagaatgggacgcagcttggtccaagaatctagatccatctggtcgagctg
cactcggtgttcatgcagctgcttatgaggatgcatcagaggttaaaaccacagtcgcga
cagatactgctcagaaacttgacgttgataaagctgcagtagctgtttga

SEQ ID NO:12 - NtASN3-T, trình tự axit amin suy luận
MCGILAVFGCIDNSQAKRSRIIELSRRLRHRGPDWSGLHSHDDCYLAHQRLAI
VDPTSGDQPLYNEDKTIVVAVNGEIYNHRDLREKLKSHQFRTGSDCEVIAHLY
EDYGEDFVHMLDGMFSFVLLDTRDKSFIAARDAIGITPLYMGWGLDGSVWFS
SEMKALSDDCERFVSFLPGHIYSSKNGGLRRWYNPPWYSETIPSTPYDHLVLR
KAFEKAVVKRLMTDVPFGVLLSGGLDSSLVAAVANRYLADTEAARQWGSQL
HTFCVGLKGSPDLKAAREVADYLGTRHHEFHFTVQEGIDALDEVIYHVETYD
VTTIRASTPMFLMSRKIKSLGVKMVLSGEGSDEIFGGYLYFHKAPNKEEFHQE
TCRKIKALHLYDCLRANKSTSAWGVEARVPFLDKEFVNVAMNMDPESKMIRP
DLGRIEKWVLRNAFDDDQNPYLPKHILYRQKEQFSDGVGYSWIDGLKDHASR
LVSDSMLANASFVYPHNTPTTKEGYYYRTIFERYFPKNAARETVPGGPSVACS

TAKAVEWDAAWSKNLDPSGRAALGVHAAAYEDASEVKTTVATDTPQKLEV
DKAAVAV

SEQ ID NO: 13 – trình tự ADN của đoạn mồi *NtASN1*, ASN1-f
tcacatatattccctcataacacac

SEQ ID NO: 14 – trình tự ADN của đoạn mồi *NtASN1*, ASN1-r
aagaagcatcccactctacagctt

SEQ ID NO: 15 – trình tự ADN của đoạn mồi *NtASN5*, ASN5-f
atatcttccctcacaacactccaact

SEQ ID NO: 16 – trình tự ADN của đoạn mồi *NtASN5*, ASN5-r
Ctaccggaaggatcaaggttgt

SEQ ID NO: 17 – trình tự mã hóa ADN từ *NtASN1-S* được sử dụng để làm im lặng cả hai bản sao *NtASN1-S* và *NtASN1-T*
tcacatatattccctcataacacacccattacaaaggaagcatactactataggatgattttcgagcgctttttcccacagaattc
agctgggctaaccgttcctggaggagcaagtgtggcgtgtagcacagctaaagctgtagagtgggatgcttcttggtcaaag
aaccttgatccttcaggcagggctgctattggtgtacataactcggcttatgagaatcatgtacctgctatggctaatgggaattt
gaccaaaaaaatcattggtcgtgtgccttctatggtagaagttggtgctgctcccgagctcacaataaagagttag

SEQ ID NO: 18 – trình tự mã hóa ADN từ *NtASN5-T* được sử dụng để làm im lặng cả hai bản sao *NtASN5-S* và *NtASN5-T*
gaccagattggagtgggatatatcaacatggtgatttttacttagcacatcaacgtttagcaattatcgatcctacttctggtgatc
agcctctgtttaatcaagataagactattgttgttacagtcaatggagaaatttacaatcatgagaaacttcgtaatcttatgccta
atcacaagttcagaaccggaagtgattgtgatgttattgcacatctttatgaagaatatggagaaaattttgtggacatgttggat
ggggtgttctcttttgtattgttggatacgcgcgataacagctttcttgctgctcgtgatgcgattggaattactcccctctatattg
gttggggacttgatgg

SEQ ID NO: 19 - trình tự ADN của thể mang đột biến kết thúc ASN1-S: ASN1-S_W156*

atgtgcgggatcttggctgttttgggttgttctgatgattctcaggccaaaagggttcgtgttctcgagctctctcgcaggtaggt
tgaagcatcgtggaccagattggagtgggctgtatcaacatggggactgttacttggcacatcagcgtctagctattgttgatc
ctgcttccggtgatcaacctctgtttaacgaagataagacgattgttgttacggtaggtaaatggagagatctacaatcacgag
caacttcgtaagcaaatgcctaatcataagttccggactggcagtgactgtgatgtcattgcacacctagtagtatgaagaaca
tggagaagattttgtggacatgctggatgggatcttcgcttttgtgttattggatactcgagataacagctttcttgttgctcgtgat
gccattggaattacttccctttatattggttggggacttgatggtagggtctgtatgaatatcatctgagcttaagggcttgaatg
atgactgcgaacattttgaagttttcccaccagggcacttgtactctagcaagaatggcggctttaggaggtggtacaatcctc
cttggttctctgaggccattccttccactcgttatgatcccttagttctcaggcgtgcctttgaaaatgtaggctgttatcaaaagg
ttgatgactgatgtccccttggtgttctcctctccgggggactcgattcatccttggttgcttcgattactgctcgctacttggctg
gtacaaaggctgccaagcagtggggagcacagcttcattccttctgtgttggccttgaggtagggctcaccggatctcaagg
ctgcaagagaagttgctgactacttgggaaccgttcaccacgagtttcacttcaccgttcaggtaggatggaattgatgcaatt
gaagatgttatttaccatattgagacatacgatgtaacgacaatcagagcaagcactcctatgttccttatgtcgcgtaagatta
agtcactaggagtgaagatggtcatatctggggaaggatctgatgaagtgtttggtggctacttgtactttcacaaggctccca
acaaggaagagttccacaaggaaacatgtcgcaaggtagattaaagcgcttcaccaatatgactgcttaagagcaaataagt
caacatctgcatggggtttagaagctagagtccctttcctagataaggagttcatcaatgttgccatgagtattgatccagagtg
gaagttgagattaaaccagagcaaaggaggattgaaaagtgggctctaaggagggcctttgatgatgaggagcatccttatc
tcccaaaggtagcacatcctgtataggcaaaaagaacaattcagtgatggcgtgggcatagttggatagatggactcaaagc
acatgctgaacaacatgtaggtgaccaataggatgatgtttaatgcttcacatatattccctcataacacacccattacaaagga
agcatactactataggatgattttcgagcgctttttcccacaggtagaattcagctgggctaaccgttcctggaggagcaagtg
tggcgtgtagcacagctaaagctgtagagtgggatgcttcttggtcaaagaaccttgatccttcaggcagggctgctattggt
gtacataactcggcttatgagaatcatgtacctgctatggctaatgggaatttgaccaaaaaaatcattggtcgtgtgccttctat
ggtagaagttggtgctgctcccgagctcacaataaagagt

SEQ ID NO: 20 - trình tự axit amin của thể mang đột biến kết thúc ASN1-S: ASN1-S_W156*

MetCysGlyIleLeuAlaValLeuGlyCysSerAspAspSerGlnAlaLysArgValArgValLeuGluLeuSerArgArgLeuLysHisArgGlyProAspTrpSerGlyLeuTyrGlnHisGlyAspCysTyrLeuAlaHisGlnArgLeuAlaIleValAspProAlaSerGlyAspGlnProLeuPheAsnGluAspLysThrIleValValThrValAsnGlyGluIleTyrAsnHisGluGlnLeuArgLysGlnMetProAsnHisLysPheArgThrGlySerAspCysAspValIleAlaHisLeuTyrGluGluHisGlyGluAspPheValAspMetLeuA

spGlyIlePheAlaPheValLeuLeuAspThrArgAspAsnSerPheLeuValAlaArgAspAlaIleGly
IleThrSerLeuTyrIleGlyTrpGlyLeuAspGlySerVal**STOP**

SEQ ID NO: 21 - trình tự ADN của thể mang đột biến kết thúc ASN1-T: ASN1-T_W156*

atgtgcgggatcttggctgttttgggttgttctgatgattctcaggccaaaagggttcgtgttctcgagctctctcgcaggtaggt
tgaagcatcgtggaccagattggagtgggctgtatcaacatggggactgttacttggcacatcagcgtctagctattgttgatc
ctgcttccggtgatcaacctctgtttaacgaagataagacgattgttgttacggtaggtaaatggagagatctacaatcacgag
caacttcgcaagcaaatgcctgatcataagttccggactggaagtgactgtgatgtcattgcacacctagtagtatgaagaac
atggagaagattttgtggacatgctggatgggatcttcgcttttgtgttactggatactcgagataacagctttcttgttgctcgtg
atgccattggaattacttccctttatattggttggggacttgatggtagggtctgtatgaatatcatctgagcttaagggcttgaat
gatgactgcgaacattttgaagttttcccaccaggacacttgtactctagcaagaatggcggctttaggaggtggtacaatcct
ctttggttctctgaggctattccttccactccttatgatcccttagttctcaggcgcgcctttgaaaatgtaggctgttatcaaaag
gttgatgactgatgtccctttggtgttctgctctccgggggactcgattcatccttggttgcttcgattactgcccgctacttggct
ggcacaaaggctgccaagcagtggggagcacagcttcattccttctgtgttggccttgaggtagggatcaccggatctcaag
gctgcaagagaagttgctgactacttgggaaccgttcaccacgagtttcacttcaccgttcaggtaggatggaattgatgcaat
tgaagatgttatttaccatattgagacatacgatgtaacgacaatcagagcaagcactcctatgttccttatgtcgcgtaagatta
agtcactaggagtgaagatggttatatctggggaaggctctgatgaagtgtttggtggctacttgtactttcacaaggctccca
acaaggaagagttccacaaggaaacatgtcgcaaggtagattaaagcacttcaccaatatgactgtttaagagcaaataagt
caacatctgcatggggcttagaagctagagtgcctttcctagataaggagttcatcaatgttgccatgagtattgatccagagt
ggaagttggtagattaaaccagagcaaaggaggattgagaagtgggctctaaggagggcctttgatgatgaggagcatcc
ctatctcccaaaggtagcacatcctatacaggcagaaagaacaattcagtgatggcgtaggctatagttggatagatggactc
aaagcacatgctgaacaacatgtaggtgaccaataggatgatgcttaatgcttcacatatattccctcataacacaccgattac
aaaggaagcatactattataggatgattttcgagcgctttttcccacaggtagaattcagctgggctaaccgttcctggaggag
cgagtgtggcgtgtagcacagctaaagctgtagagtgggatgcttcttggtcaaagaaccttgatccttcaggaagggctgct
attggtgtacataactcagcttatgagaatcatgaacctgctatggctaatgggaatttggccacaaaaatcattggccgtgcg
ccgtctatggtagaagttggtgctgctcatgagctcacaataaggagt

SEQ ID NO: 22 - Trình tự axit amin của thể mang đột biến kết thúc ASN1-T: ASN1-T_W156*

MetCysGlyIleLeuAlaValLeuGlyCysSerAspAspSerGlnAlaLysArgValArgValLeuGluLeuSerArgArgLeuLysHisArgGlyProAspTrpSerGlyLeuTyrGlnHisGlyAspCysTyrLeuAlaHisGlnArgLeu

AlaIleValAspProAlaSerGlyAspGlnProLeuPheAsnGluAspLysThrIleValValThrValAsnGlyGluIleTyrAsnHisGluGlnLeuArgLysGlnMetProAspHisLysPheArgThrGlySerAspCysAspValIleAlaHisLeuTyrGluGluHisGlyGluAspPheValAspMetLeuAspGlyIlePheAlaPheValLeuLeuAspThrArgAspAsnSerPheLeuValAlaArgAspAlaIleGlyIleThrSerLeuTyrIleGlyTrpGlyLeuAspGlySerVal**STOP**

SEQ ID NO: 23 - trình tự ADN của thể mang đột biến kết thúc ASN5-S: ASN5-S_Q66*

atgtgtggaatcttggctttgttgggttgttcagatgattctcaggccaaaagggttcgagttcttgagctctctcgcaggcaggttgaagcatcgtggaccagattggagtgggatatatcaacatggtgatttttacttagcacatcaacgtttagcaattatcgatcctgcttctggtgatcagcctctgtttaat**taa**gataagacgattgttgttacagtaggtcaatggagagatttacaatcatgagaaacttcgtaatcttatgcctaatcacaagttcagaactggaagtgattgtgatgttattgcacatcttgtagtatgaagaatatggagaaaattttgtggacatgttggatggggtgttctcttttgtattgttggatacgcgcgataacagctttcttgctgctcgtgatgcaattggaattactcccctatatattggttggggacttgatggtaggctctgtgtggatttcatctgagctaaaaggattaaatggtgactgtgaacattttgaagttttccctcccggtcacttgtactcgagcaagaatggcgggtttaggagatggtacaatcctcaatggttctctgaggctattccatcaaatccttacgacccccttagttttgagacgtgccttcgaaaatgtaggctgttatcaaacgattgatgaccgatgtcccctttggtgttctgctctccgggggacttgattcgtctttggttgcttctgtcactgctcgctacttggctggaacaaaagctgctaagcaatggggagcacagcttcattccttctgtgttggtctcgaggtagggctcaccagatctcaaggctgcaagagaagttgctgactatttgggaaccgttcaccacgagttcaccttcacagttcaggtaggatggaattgatgctattgaagatgttatttaccatatcgagacatacgatgtaacaacgatcagagcaagcactcctatgttccttatgtcgcgtaagattaaatcactgggagttaagatggtcatatcaggggaaggctcagatgaactgtttggcggctatttgtacttccacaaggctccgaacaaggaagaattccatgtggagacatgtcacaaggtagataaaagcgcttcaccaatacgactgtttgagagcaaataaggcaacatcagcatggggcttagaagctagagtaccatttctggataaagagttcatcaacgttgctatgagtatcgatcctgaatggaagatggtagattaaacacgatcatggtaggatcgagaagtgggttcttaggaaggcttttgatgatgaggagcaaccctatctccaaaggtagcatattctgtaccggcagaaagaacaattcagtgatggcgtaggctatagttggatcgatggactcaaagcacatgctgaacaacatgtaggtgactgataggatgatgcttaatgctgcacatatcttccctcacaacactccaactacaaaggaagcatactattacaggatgattttcgagaggttcttcccacaggtagaattcagcaaggctaactgttcctggaggaccgagtat

agcttgcagcacagctaaagctattgagtgggatgcttcgtggtcgaacaaccttgatccttccggtagggctgcaatcggtg
tacataactcggcttatgacgatcatctccccgatgttggtaatgggaatttggacacaacgatcatcgataatgtgccgagga
tggtaggagtgggtgctgctgcagagctcacaataaggagc

SEQ ID NO: 24 - trình tự axit amin của thể mang đột biến kết thúc ASN5-S: ASN5-S_Q66*MetCysGlyIleLeuAlaLeuLeuGlyCysSerAspAspSerGlnAlaLysArgValArgVal
LeuGluLeuSerArgArgLeuLysHisArgGlyProAspTrpSerGlyIleTyrGlnHisGlyAspPheT
yrLeuAlaHisGlnArgLeuAlaIleIleAspProAlaSerGlyAspGlnProLeuPheAsn**STOP**

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó có sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm, asparagin synthetaza đã nêu bao gồm:

(i) trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7; hoặc

(ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i); hoặc

(iii) polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8;

trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii) hoặc (iii) được giảm so với cây đối chứng.

2. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó cây này bao gồm ít nhất một sự thay đổi di truyền trong vùng điều hòa hoặc trong trình tự mã hóa của polynucleotit mã hóa asparagin synthetaza.

3. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm tạo ra sự giảm nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó so với nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây đối chứng; và/hoặc

trong đó sự biểu hiện hoặc hoạt tính của asparagin synthetaza giảm tạo ra sự giảm nồng độ acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó so với lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây đối chứng; và/hoặc

trong đó nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là khoảng 22% và lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển

gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thấp hơn ít nhất là 24% so với lá được xử lý hoặc làm khô và sol khí của cây đối chứng.

4. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó nồng độ nicotin trong lá được xử lý hoặc làm khô từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó về cơ bản là giống như nồng độ nicotin trong lá được xử lý hoặc làm khô của cây đối chứng; và/hoặc

trong đó sự tạo ra glutamin, axit aspartic và axit glutamic được gia tăng trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó so với lá được xử lý hoặc làm khô của cây đối chứng.

5. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó cây bao gồm ít nhất là một đột biến trong mỗi bản sao của trình tự polynucleotit mã hóa asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii) hoặc (iii).

6. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó trình tự nucleotit asparagin synthetaza bao gồm trình tự nucleotit mã hóa đột biến kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí của trình tự nucleotit mã hóa đột biến kết thúc trong các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc trong đó asparagin synthetaza bao gồm trình tự nucleotit mã hóa codon kết thúc ở vị trí tương đương với vị trí của codon kết thúc trong các SEQ ID No. 20, 22 và 24.

7. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó asparagin synthetaza bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc bao gồm trình tự polypeptit đã nêu trong các SEQ ID No. 20, 22 và 24; và/hoặc

trong đó lượng sinh khối lá từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó thực vật về cơ bản là giống như lượng sinh khối lá từ cây đối chứng.

8. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 3, trong đó lá được xử lý trong không khí.

9. Nguyên liệu thực vật hoặc nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc được làm khô từ cây theo điểm 1.

10. Sản phẩm thực vật bao gồm ít nhất một phần của cây theo điểm 1.

11. Phương pháp tạo ra nguyên liệu cây thuốc lá với nồng độ asparagin giảm và các nồng độ của acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu cây thuốc lá đã nêu so với nguyên liệu thực vật từ cây thuốc lá đối chứng, phương pháp đã nêu bao gồm các bước:

(a) tạo ra cây thuốc lá hoặc một phần của nó gồm có polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza và có độ tương đồng trình tự ít nhất là 95% với SEQ ID NO:1 hoặc SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7;

(b) giảm sự biểu hiện của polynucleotit hoặc hoạt tính của protein được mã hóa bởi chúng trong cây thuốc lá hoặc một phần của nó;

(c) thu hoạch nguyên liệu thực vật từ cây thuốc lá hoặc một phần của nó;

(d) làm khô hoặc xử lý nguyên liệu cây thuốc lá;

(e) tùy ý là, đo nồng độ của asparagin trong cây thuốc lá hoặc bộ phận của nó và/hoặc đo nồng độ của acrylamit trong sol khí có nguồn gốc từ cây thuốc lá hoặc một phần của nó; và

(f) thu nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô với nồng độ asparagin giảm và nồng độ giảm acrylamit trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu cây thuốc lá.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô trong ít nhất là khoảng 3 ngày sau khi thu hoạch; và/hoặc

trong đó nguyên liệu thực vật được xử lý trong không khí.

13. Nguyên liệu thực vật thu được hoặc có thể thu được bằng phương pháp theo điểm 11.

14. Phương pháp tạo ra nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô so với cây đối chứng, phương pháp đã nêu bao gồm các bước:

(a) tạo ra cây theo điểm 8;

(b) thu hoạch nguyên liệu thực vật từ cây;

(c) xử lý hoặc làm khô nguyên liệu thực vật trong một khoảng thời gian; và

(d) thu nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô mà có nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô.

15. Sản phẩm thuốc lá hoặc vật dụng hút thuốc bao gồm nguyên liệu thực vật theo điểm 9.

16. Sản phẩm thuốc lá hoặc vật dụng hút thuốc bao gồm nguyên liệu thực vật theo điểm 13.

17. Sản phẩm thực vật bao gồm ít nhất nguyên liệu thực vật theo điểm 9.

18. Phương pháp tạo ra nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô so với cây đối chứng, phương pháp đã nêu bao gồm các bước:

(a) tạo ra nguyên liệu thực vật theo điểm 9;

(b) thu hoạch nguyên liệu thực vật từ thực vật;

(c) xử lý hoặc làm khô nguyên liệu thực vật trong một khoảng thời gian; và

(d) thu nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô mà có nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô.

19. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó có asparagin synthetaza giảm bao gồm:

(i) trình tự polynucleotit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1 hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7, trong đó cây đối chứng không bao gồm polynucleotit; hoặc

(ii) polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit đã nêu trong (i), trong đó cây đối chứng không bao gồm polypeptit; hoặc

(iii) polypeptit có độ tương đồng trình tự ít nhất là 78% với SEQ ID NO:2 hoặc SEQ ID NO:4 hoặc SEQ ID NO:6 hoặc SEQ ID NO:8, trong đó cây đối chứng không bao gồm polypeptit, và

trong đó cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến bao gồm về cơ bản là lượng nicotin giống với cây đối chứng hoặc chứa lượng nicotin cao hơn cây đối chứng.

20. Phương pháp biến đổi cây thuốc lá để có polynucleotit bao gồm trình tự mã hóa asparagin synthetaza có độ tương đồng trình tự ít nhất là 90% với SEQ ID NO:1 hoặc độ tương đồng trình tự ít nhất là 72% với SEQ ID NO:3 hoặc SEQ ID NO:5 hoặc SEQ ID NO:7, trong đó cây đối chứng không bao gồm polynucleotit, và trong đó cây thuốc lá bị biến đổi bao gồm về cơ bản là lượng nicotin giống với cây đối chứng hoặc chứa lượng nicotin cao hơn cây đối chứng.

21. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 3, trong đó nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó được giảm xuống ít nhất là 17% so với cây đối chứng; và/hoặc

trong đó nồng độ acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó được giảm xuống ít nhất là 20% so với lá được xử lý hoặc làm khô của cây đối chứng; và/hoặc

trong đó nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó ít nhất là khoảng 44% thấp hơn và lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng

hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó ít nhất là 66% thấp hơn so với lá được xử lý hoặc làm khô và sol khí của thực vật đối chứng.

22. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 3, trong đó nồng độ asparagin trong lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó ít nhất là khoảng 70% thấp hơn và lượng acrylamit trong sol khí được tạo ra sau khi làm nóng hoặc đốt cháy lá được xử lý hoặc làm khô có nguồn gốc từ cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó ít nhất là 88% thấp hơn so với lá được xử lý hoặc làm khô và sol khí của cây đối chứng.

23. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó cây là cây thuốc lá *Nicotiana tabacum*.

24. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó cây là cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* kiểu Burley.

25. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 5, trong đó cây bao gồm (các) đột biến kết thúc và/hoặc (các) mảnh gen mà cản trở sự dịch mã bản sao phiên mã ARN mã hóa asparagin synthetaza trong mỗi bản sao của trình tự polynucleotit mã hóa asparagin synthetaza đã nêu trong (i), (ii), hoặc (iii).

26. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 8, trong đó lá được xử lý trong không khí được xử lý dưới nắng hoặc xử lý bằng lửa; hoặc trong đó lá được hong khô.

27. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 26, trong đó lá hong khô được phơi khô hoặc sấy khô.

28. Phương pháp theo điểm 11, trong đó lượng nicotin trong nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật đã nêu về cơ bản là giống với lượng nicotin trong cây đối chứng.

29. Phương pháp theo điểm 11, trong đó sự tạo ra glutamin, axit aspartic và axit glutamic được gia tăng trong nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật đã nêu so với lá được xử lý hoặc làm khô của cây đối chứng.

30. Phương pháp theo điểm 12, trong đó lá được xử lý trong không khí được xử lý dưới nắng hoặc xử lý bằng lửa, hoặc trong đó nguyên liệu thực vật được hong khô hoặc phơi khô hoặc sấy khô.

31. Phương pháp theo điểm 14, trong đó lượng nicotin trong nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô về cơ bản là giống với trong cây đối chứng.

32. Phương pháp theo điểm 14, trong đó sự tạo ra glutamin, axit aspartic và axit glutamic được gia tăng trong nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô như so với cây đối chứng.

33. Phương pháp theo điểm 18, trong đó lượng nicotin trong nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô về cơ bản là giống với cây đối chứng.

34. Phương pháp theo điểm 18, trong đó sự tạo ra glutamin, axit aspartic và axit glutamic trong nguyên liệu thực vật với nồng độ asparagin giảm và nồng độ acrylamit giảm trong sol khí có nguồn gốc từ nguyên liệu thực vật được xử lý hoặc làm khô được gia tăng như so với cây đối chứng.

35. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó asparagin synthetaza bao gồm trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc được mã hóa bởi trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID No. 19, 21 và 23, hoặc bao gồm trình tự polypeptit đã nêu trong các SEQ ID No. 20, 22 và 24.

36. Phương pháp theo điểm 11, trong đó lượng nicotin trong nguyên liệu cây thuốc lá được làm khô hoặc xử lý về cơ bản là giống, hoặc cao hơn, trong nguyên liệu thực vật từ cây thuốc lá đối chứng.

37. Cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc đột biến hoặc bộ phận của nó theo điểm 1, trong đó lượng nicotin trong cây thuốc lá chuyển gen, không có trong tự nhiên hoặc bộ phận của nó về cơ bản là giống, hoặc cao hơn, trong cây thuốc lá đối chứng hoặc bộ phận của nó.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Philip Morris Products S.A.

<120> CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN, KHÔNG CÓ TRONG TỰ NHIÊN HOẶC ĐỘT BIẾN HOẶC BỘ PHẬN CỦA NÓ, NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT, SẢN PHẨM THỰC VẬT, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA NGUYÊN LIỆU THỰC VẬT, SẢN PHẨM THUỐC LÁ HOẶC VẬT DỤNG HÚT THUỐC VÀ PHƯƠNG PHÁP BIẾN ĐỔI CÂY THUỐC LÁ

<130> P10251EP

<140> 15184528.6

<141> 2015-09-09

<160> 24

<170> Sáng chế bản 3.5

<210> 1

<211> 3646

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 1

atgtgcggga tcttggctgt tttgggttgt tctgatgatt ctcaggccaa aagggttcgt 60

gttctcgagc tctctcgcag gtaaattata tttcccttct tttctgtatt gttaatgtta 120

ttgtgttgcg ttattatatt gattcttttt atgagaaagt agtttcctga acgtttgcat 180

tttagaataa aagaagacta aagcttaaga tagattatat atttagatat tcttgacgtg 240

gacctatatc ttagattcac aatataattt tctcggacca actgttttag catgacttgt 300

aaatgatgtt gatatgaaaa gctgtgattt aattagtagg agtaattcat ttccatgtta 360

caattactta tctttctcct ccttgtgttc ttgccactgc tagaggcaga tctataattc 420

ctacttagag tattgaacac attgtacttt tgaaattgta agtgtgcagt ttaatatttg 480

ttaaaatttt gaaggttttt ttaattacat gtatatcgtg acgttatata gcctctctac 540

ccgcataagg taggggtaat gtctgcgtac aaataggctg atttcactct gtgttcagtt 600

gaatcaatat atgcggcatc caccactgtt tgcaaatgca tgggaatgga aaagtcatgc 660

ctcatcactg tcacacatga tttttattta tttatttatt atatatgatt ctttaaatct 720

attagtgggt actgaatctt gctaactgat cgattgatga aacaggttga agcatcgtgg 780

accagattgg agtgggctgt atcaacatgg ggactgttac ttggcacatc agcgtctagc 840

tattgttgat cctgcttccg gtgatcaacc tctgtttaac gaagataaga cgattgttgt 900

tacggtgggt gcttttaatt tcatgtttac tctcatttct tgctcagttt actgatgaaa 960

acgaaactaa tgctgataac tatcaaccaa tcaaccacat acaagtaggg gtcgactata 1020

tgattcatta tatcctttcc tctattcaaa tagttgatga ttaatttcat gccaaaaatt 1080

tcaggtaaat ggagagatct acaatcacga gcaacttcgt aagcaaatgc ctaatcataa 1140

gttccggact ggcagtgact gtgatgtcat tgcacaccta gtgagtactc atcttccaac 1200

ttaggaaaca tgtatgtata tgtaaaatta ttccctgatt atattatgta cattaatcag 1260

tatgaagaac atggagaaga ttttgtggac atgctggatg ggatcttcgc ttttgtgtta 1320

ttggatactc gagataacag ctttcttgtt gctcgtgatg ccattggaat tacttccctt 1380

tatattggtt ggggacttga tggtaagatt ccatatgatt ttctcactta gattttgtta 1440

ttgcaaatga atatgttgaa tccttatatg tactaattgt tgtaattctg ttccttctca 1500

gggtctgtat ggatatcatc tgagcttaag ggcttgaatg atgactgcga acattttgaa 1560

gttttcccac cagggcactt gtactctagc aagaatggcg gctttaggag gtggtacaat 1620

cctccttggt tctctgaggc cattccttcc actcgttatg atcccttagt tctcaggcgt 1680

gcctttgaaa atgtgagtta atattgttgt tgttgaaatg gatccaacat gttggtttta 1740

aggctatata tcattttgca ggctgttatc aaaaggttga tgactgatgt ccccttggt 1800

gttctcctct ccgggggact cgattcatcc ttggttgctt cgattactgc tcgctacttg 1860

gctggtacaa aggctgccaa gcagtgggga gcacagcttc attccttctg tgttggcctt 1920

gaggtcagat aatcttgaga cttgtgtgat tacaacatta ataacgacaa cacctcattc 1980

acaagctagt aaggtcagct atatgaaatc tgataccgat ttgcttgctt tcaccgaaca 2040

gggctcaccg gatctcaagg ctgcaagaga agttgctgac tacttgggaa ccgttcacca 2100

cgagtttcac ttcaccgttc aggttttgat ggagcaactc tattttcact tgatctatca 2160

tcctcttcgt ttctcctttg tttacctgat ggcaaatgac atgtgttgta tttgcaggat 2220

ggaattgatg caattgaaga tgttatttac catattgaga catacgatgt aacgacaatc 2280

agagcaagca ctcctatgtt ccttatgtcg cgtaagatta agtcactagg agtgaagatg 2340

gtcatatctg gggaaggatc tgatgaagtg tttggtggct acttgtactt tcacaaggct 2400

cccaacaagg aagagttcca caaggaaaca tgtcgcaagg tataagaaag tgcttccagt 2460

tcctagttta aataggacaa ggagttgaga aaatgttgat tttttcccta tgcagattaa 2520

agcgcttcac caatatgact gcttaagagc aaataagtca acatctgcat ggggtttaga 2580

agctagagtc cctttcctag ataaggagtt catcaatgtt gccatgagta ttgatccaga 2640

gtggaagttg gtaagtagtt gacccccaat tgttgatcga ataaacaatc aactgtccct 2700

aaaactatgt atttattcat ttcagattaa accagagcaa aggaggattg aaaagtgggc 2760

tctaaggagg gcctttgatg atgaggagca tccttatctc ccaaaggtgt actaaatcgc 2820

cattttcaaa ctgatttgca aatgattttg aatgttatat tattaatcaa actaacaatt 2880

tactcattac attccttgca gcacatcctg tataggcaaa aagaacaatt cagtgatggc 2940

gtgggctata gttggataga tggactcaaa gcacatgctg aacaacatgt gcgtttcaat 3000

gactaatcaa cgactttcta ctgctcttat ttatcttcca atgcttgttt gttttaaagc 3060

tgaccgagga aacaaatttt ttcctttaat aggtgaccaa taggatgatg tttaatgctt 3120

cacatatatt ccctcataac acacccatta caaaggaagc atactactat aggatgattt 3180

tcgagcgctt tttcccacag gtaatttgtt cagataatag tgagaattta tgataaatgg 3240

actaatttac gtttgttgtc gattttgcaa ccttccaaca gtgtgagcaa gctcacataa 3300

tcggaatttt ttgttcaaat aataatgcat tggaaatcat aatgctaaat tgagatttac 3360

ttttaaccat gttcctctac catttttggt tctgcagaat tcagctgggc taaccgttcc 3420

tggaggagca agtgtggcgt gtagcacagc taaagctgta gagtgggatg cttcttggtc 3480

aaagaacctt gatccttcag gcagggctgc tattggtgta cataactcgg cttatgagaa 3540

tcatgtacct gctatggcta atgggaattt gaccaaaaaa atcattggtc gtgtgccttc 3600

tatggtagaa gttggtgctg ctcccgagct cacaataaag agttag 3646

<210> 2

<211> 590

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 2

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Gln Ala
1 5 10 15

Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly
20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Leu Tyr Gln His Gly Asp Cys Tyr Leu Ala His
35 40 45

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

Asn Glu Asp Lys Thr Ile Val Val Thr Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

His Glu Gln Leu Arg Lys Gln Met Pro Asn His Lys Phe Arg Thr Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Asp Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Glu His Gly Glu Asp
100 105 110

Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Ile Phe Ala Phe Val Leu Leu Asp Thr
115 120 125

Arg Asp Asn Ser Phe Leu Val Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Ser

130 135 140

Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val Trp Ile Ser Ser Glu
145 150 155 160

Leu Lys Gly Leu Asn Asp Asp Cys Glu His Phe Glu Val Phe Pro Pro
165 170 175

Gly His Leu Tyr Ser Ser Lys Asn Gly Gly Phe Arg Arg Trp Tyr Asn
180 185 190

Pro Pro Trp Phe Ser Glu Ala Ile Pro Ser Thr Arg Tyr Asp Pro Leu
195 200 205

Val Leu Arg Arg Ala Phe Glu Asn Ala Val Ile Lys Arg Leu Met Thr
210 215 220

Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser Leu
225 230 235 240

Val Ala Ser Ile Thr Ala Arg Tyr Leu Ala Gly Thr Lys Ala Ala Lys
245 250 255

Gln Trp Gly Ala Gln Leu His Ser Phe Cys Val Gly Leu Glu Gly Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Lys Ala Ala Arg Glu Val Ala Asp Tyr Leu Gly Thr Val

275 280 285

His His Glu Phe His Phe Thr Val Gln Asp Gly Ile Asp Ala Ile Glu

290 295 300

Asp Val Ile Tyr His Ile Glu Thr Tyr Asp Val Thr Thr Ile Arg Ala

305 310 315 320

Ser Thr Pro Met Phe Leu Met Ser Arg Lys Ile Lys Ser Leu Gly Val

325 330 335

Lys Met Val Ile Ser Gly Glu Gly Ser Asp Glu Val Phe Gly Gly Tyr

340 345 350

Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys Glu Glu Phe His Lys Glu Thr

355 360 365

Cys Arg Lys Ile Lys Ala Leu His Gln Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn

370 375 380

Lys Ser Thr Ser Ala Trp Gly Leu Glu Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp

385 390 395 400

Lys Glu Phe Ile Asn Val Ala Met Ser Ile Asp Pro Glu Trp Lys Leu

405 410 415

Ile Lys Pro Glu Gln Arg Arg Ile Glu Lys Trp Ala Leu Arg Arg Ala

420 425 430

Phe Asp Asp Glu Glu His Pro Tyr Leu Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg
435 440 445

Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly
450 455 460

Leu Lys Ala His Ala Glu Gln His Val Thr Asn Arg Met Met Phe Asn
465 470 475 480

Ala Ser His Ile Phe Pro His Asn Thr Pro Ile Thr Lys Glu Ala Tyr
485 490 495

Tyr Tyr Arg Met Ile Phe Glu Arg Phe Phe Pro Gln Asn Ser Ala Gly
500 505 510

Leu Thr Val Pro Gly Gly Ala Ser Val Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala
515 520 525

Val Glu Trp Asp Ala Ser Trp Ser Lys Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg
530 535 540

Ala Ala Ile Gly Val His Asn Ser Ala Tyr Glu Asn His Val Pro Ala
545 550 555 560

Met Ala Asn Gly Asn Leu Thr Lys Lys Ile Ile Gly Arg Val Pro Ser

565 570 575

Met Val Glu Val Gly Ala Ala Pro Glu Leu Thr Ile Lys Ser

580 585 590

<210> 3

<211> 4564

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> misc_dấu hiệu

<222> (3137)..(3137)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 3

atgtgcggga tcttggctgt tttgggttgt tctgatgatt ctcaggccaa aagggttcgt 60

gttctcgagc tctctcgcag gtaaattata ttcccttctt ttctctattg ttaatgttat 120

tgtgttgcat gcgttattaa ttctttttat gagaaagtag tttcctgagc gtttggagct 180

gctactgatt gcttgcattt tagaataaaa cttaagatgg attatatatt tagatattct 240

tgacgtggac ctatatctta gattcacaat tttctcggac caactgtttt agcatgactt 300

gtatatgatg ttgatatgaa aagctgtggt ttagtaattc atttccatgt tacaattact 360

aatctttctc ctatctgtgt tcttgccact gctagaggca gatctataat tcgtaattag 420

agtattgaac acattgtact tttcaaaatt ataagtgcgc aatttaatat ttgttaaaat 480

tttgaaggct tttttaatta catgtatatc gtgtctcgta tagcctctct acccatgtaa 540

ggtctgcgta cacattaccc gccccatgcc ctcccgtgaa attttactgg ggtttgctgt 600

tgttgttggt atcgtgtgtc gcatatactt tgttctgttg aatcaatata tgcgtcatct 660

gccactgttt gcaaatgcat ggaatggaaa agtcatgcct catcactgtc acacaggatt 720

tttatttatt tatttattta ttatatatga ttctttttct tgatgtgaaa tctattagtg 780

ggtactgaat ctggctaact gactaatgaa acaggttgaa gcatcgtgga ccagattgga 840

gtgggctgta tcaacatggg gactgttact tggcacatca gcgtctagct attgttgatc 900

ctgcttccgg tgatcaacct ctgtttaacg aagataagac gattgttgtt acggtgggtg 960

cttttaattt catgtttact ctcatttctt gctcagttta ctgatgaaca tgaaactaat 1020

gactatcaat cagccaatca accacgctta attccataca agtaggggtc gactatatga 1080

ttcattatat cctttcctct attccggttc ctttttattc aaatagttga tgattaattt 1140

catgccaaaa atttcaggta aatggagaga tctacaatca cgagcaactt cgcaagcaaa 1200

tgcctgatca taagttccgg actggaagtg actgtgatgt cattgcacac ctagtgagta 1260

atctagatta ctcatcttcc aacttaggaa acatgtatgt attcccctga ttatttcatc 1320

atctttatgt acattaatca gtatgaagaa catggagaag attttgtgga catgctggat 1380

gggatcttcg cttttgtgtt actggatact cgagataaca gctttcttgt tgctcgtgat 1440

gccattggaa ttacttccct ttatattggt tggggacttg atggtaagat tccatattat 1500

tttctcactt agattttgtt attgcaaatg aatatgttga atctttatat gtagtaactg 1560

ttgtaatttg gttccttctc agggtctgta tggatatcat ctgagcttaa gggcttgaat 1620

gatgactgcg aacattttga agttttccca ccaggacact tgtactctag caagaatggc 1680

ggctttagga ggtggtacaa tcctctttgg ttctctgagg ctattccttc cactccttat 1740

gatcccttag ttctcaggcg cgcctttgaa aatgtgagtt attattgttg ttgttgaaat 1800

ggatccaaca tgttggttct aaggctggat atcattgtgc aggctgttat caaaaggttg 1860

atgactgatg tccctttttgg tgttctgctc tccgggggac tcgattcatc cttggttgct 1920

tcgattactg cccgctactt ggctggcaca aaggctgcca agcagtgggg agcacagctt 1980

cattccttct gtgttggcct tgaggtcaga taatcttgag atttctgtga ttacaacatt 2040

aataacgacc acacctcatt cacaagctag taaggtcagc tatatgaatc tgataccgat 2100

ttgcttgctt tcaaacgaac agggatcacc ggatctcaag gctgcaagag aagttgctga 2160

ctacttggga accgttcacc acgagtttca cttcaccgtt caggtattga tggagcaact 2220

ctattttgac ttgatctatc atcctctgcg ttccctttttg tttacctgat ggcaaatgac 2280

atgtgtcgta tttgcaggat ggaattgatg caattgaaga tgttatttac catattgaga 2340

catacgatgt aacgacaatc agagcaagca ctcctatgtt ccttatgtcg cgtaagatta 2400

agtcactagg agtgaagatg gttatatctg gggaaggctc tgatgaagtg tttggtggct 2460

acttgtactt tcacaaggct cccaacaagg aagagttcca caaggaaaca tgtcgcaagg 2520

tataaaaaag tgtttccagt tccttgttta aaaccttatt taaataggat aagcaacaac 2580

aacaacaaca acccagtata atcccactag tggggtctga ggagggtatt gtgtatgcag 2640

accttacccc taccctgggg tagagaggct gtttcagata gaaactcgac tccctccctc 2700

caaaaacctt atttaaatag gacaaggagt tgagaaaatg ttgatctttt tcctccatct 2760

ctatgcagat taaagcactt caccaatatg actgtttaag agcaaataag tcaacatctg 2820

catggggctt agaagctaga gtgcctttcc tagataagga gttcatcaat gttgccatga 2880

gtattgatcc agagtggaag ttggtaagta gttgaacccc aattgttgat cgaataaacg 2940

atcaactgtc cctaaaacct tgtattctat ccatttcaga ttaaaccaga gcaaaggagg 3000

attgagaagt gggctctaag gagggccttt gatgatgagg agcatcccta tctcccaaag 3060

gtggtactaa atcgcccttt tcaaactgat ttgcaagtga tttcgaatgt tatattgtta 3120

accaaactaa caatttnaag gctctgatga agtgtttggt ggctacttgt actttcacaa 3180

ggctcccaac aaagaagagt tccacaagga aacatgtcgc aaggtataaa aaagtgtttc 3240

cagttccttg tttaaaacct tatttaaata ggataagcaa caacaacaac aacaacccag 3300

tataatccca ctagtggggt ctgaggaggg tattgtgtat gcagacctta cccctaccct 3360

ggggtagaga ggctgtttca gatagaaact cgactccctc cctccaaaaa ccttatttaa 3420

ataggacaag gagttgagaa aatgttgatc ttttttcctcc atctctatgc agattaaagc 3480

acttcaccaa tatgactgtt taagagcaaa taagtcaaca tctgcatggg gcttagaagc 3540

tagagtgcct ttcctagata aggagttcat caatgttgcc atgagtattg atccagagtg 3600

gaagttggta agtagttgaa ccccaattgt tgatcgaata aacgatcaac tgtccctaaa 3660

accttgtatt ctatccattt cagattaaac cagagcaaag gaggattgag aagtgggctc 3720

taaggagggc ctttgatgat gaggagcatc cctatctccc aaaggtggta ctaaatcgcc 3780

cttttcaaac tgatttgcaa gtgatttcga atgttatatt gttaaccaaa ctaacaattt 3840

actcattaca tttcctgcag cacatcctat acaggcagaa agaacaattc agtgatggcg 3900

taggctatag ttggatagat ggactcaaag cacatgctga acaacatgtg cgtttcaatg 3960

actaatcaac aactttctaa tgttcttatt tatcttccaa tgtttgtttg ttttaaagct 4020

gacttggaat ttttttgttt cctttaatag gtgaccaata ggatgatgct taatgcttca 4080

catatattcc ctcataacac accgattaca aaggaagcat actattatag gatgattttc 4140

gagcgctttt tcccacaggt aatttgttca tgtattgtga ggattcatga taaattagct 4200

aacttatgct ggttttcaac cttgcaacct tccgataagt cacattgttg gagtttgttg 4260

ttcaaatgcg agatttactt ttaaccatgt tcctctggta tttttggttc tgcagaattc 4320

agctgggcta accgttcctg gaggagcgag tgtggcgtgt agcacagcta aagctgtaga 4380

gtgggatgct tcttggtcaa agaaccttga tccttcagga agggctgcta ttggtgtaca 4440

taactcagct tatgagaatc atgaacctgc tatggctaat gggaatttgg ccacaaaaat 4500

cattggccgt gcgccgtcta tggtagaagt tggtgctgct catgagctca caataaggag 4560

ttag 4564

<210> 4

<211> 590

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 4

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Gln Ala

1 5 10 15

Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly

20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Leu Tyr Gln His Gly Asp Cys Tyr Leu Ala His

35 40 45

Gln Arg Leu Ala Ile Val Asp Pro Ala Ser Gly Asp Gln Pro Leu Phe

50 55 60

Asn Glu Asp Lys Thr Ile Val Val Thr Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

His Glu Gln Leu Arg Lys Gln Met Pro Asp His Lys Phe Arg Thr Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Asp Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Glu His Gly Glu Asp
100 105 110

Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Ile Phe Ala Phe Val Leu Leu Asp Thr
115 120 125

Arg Asp Asn Ser Phe Leu Val Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Ser
130 135 140

Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val Trp Ile Ser Ser Glu
145 150 155 160

Leu Lys Gly Leu Asn Asp Asp Cys Glu His Phe Glu Val Phe Pro Pro
165 170 175

Gly His Leu Tyr Ser Ser Lys Asn Gly Gly Phe Arg Arg Trp Tyr Asn
180 185 190

Pro Leu Trp Phe Ser Glu Ala Ile Pro Ser Thr Pro Tyr Asp Pro Leu

195 200 205

Val Leu Arg Arg Ala Phe Glu Asn Ala Val Ile Lys Arg Leu Met Thr
210 215 220

Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser Leu
225 230 235 240

Val Ala Ser Ile Thr Ala Arg Tyr Leu Ala Gly Thr Lys Ala Ala Lys
245 250 255

Gln Trp Gly Ala Gln Leu His Ser Phe Cys Val Gly Leu Glu Gly Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Lys Ala Ala Arg Glu Val Ala Asp Tyr Leu Gly Thr Val
275 280 285

His His Glu Phe His Phe Thr Val Gln Asp Gly Ile Asp Ala Ile Glu
290 295 300

Asp Val Ile Tyr His Ile Glu Thr Tyr Asp Val Thr Thr Ile Arg Ala
305 310 315 320

Ser Thr Pro Met Phe Leu Met Ser Arg Lys Ile Lys Ser Leu Gly Val
325 330 335

Lys Met Val Ile Ser Gly Glu Gly Ser Asp Glu Val Phe Gly Gly Tyr

340 345 350

Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys Glu Glu Phe His Lys Glu Thr
355 360 365

Cys Arg Lys Ile Lys Ala Leu His Gln Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn
370 375 380

Lys Ser Thr Ser Ala Trp Gly Leu Glu Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp
385 390 395 400

Lys Glu Phe Ile Asn Val Ala Met Ser Ile Asp Pro Glu Trp Lys Leu
405 410 415

Ile Lys Pro Glu Gln Arg Arg Ile Glu Lys Trp Ala Leu Arg Arg Ala
420 425 430

Phe Asp Asp Glu Glu His Pro Tyr Leu Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg
435 440 445

Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly
450 455 460

Leu Lys Ala His Ala Glu Gln His Val Thr Asn Arg Met Met Leu Asn
465 470 475 480

Ala Ser His Ile Phe Pro His Asn Thr Pro Ile Thr Lys Glu Ala Tyr

485 490 495

Tyr Tyr Arg Met Ile Phe Glu Arg Phe Phe Pro Gln Asn Ser Ala Gly

500 505 510

Leu Thr Val Pro Gly Gly Ala Ser Val Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala

515 520 525

Val Glu Trp Asp Ala Ser Trp Ser Lys Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg

530 535 540

Ala Ala Ile Gly Val His Asn Ser Ala Tyr Glu Asn His Glu Pro Ala

545 550 555 560

Met Ala Asn Gly Asn Leu Ala Thr Lys Ile Ile Gly Arg Ala Pro Ser

565 570 575

Met Val Glu Val Gly Ala Ala His Glu Leu Thr Ile Arg Ser

580 585 590

<210> 5

<211> 5276

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 5

atgtgtggaa tcttggcttt gttgggttgt tcagatgatt ctcaggccaa aagggttcga 60

gttcttgagc tctctcgcag gcaatttccc ctttcttttc tcttttattt tattactcca 120

tcatataatt attctacttt caccttttt gttttttaat ttcgatttgt ttgctttttg 180

ctttcttcat ttaatgttct tgcattgctc tagctcctat acgaataata ggagctaaag 240

taatagagtg aaggattatt ttggagcaac ggtaaagtta tttttgtata gttcacaggt 300

tggagccgta aaagcagtta ctagtgtttg cattagggta agttgtctat caggaaagat 360

atttgtagca attgaccacc ctttggcaaa aaattatgcg taaaatatta ctacttgtta 420

ttgattcaaa aaatatgact ttgaacatcc ttgtatagcc tagtggcaaa gggtgttcaa 480

aatttttgaa caccttatt gaattttctg gtttcgtcgt tgctgtctac aacacactct 540

cgaagtgcgg ccttccctca aaccctacgt gaatatggaa cgcctagtgt gccgggatgc 600

cctttaggct gagtaataga gtactatgtt gatataccta aaatacggaa ctggcacgag 660

agataaattc agaatttata gcttaattat ttaaaattta tcatttgatt tatttcaacc 720

agagttcatt ctagtagagt ttatgttgca tatttgtctg atttgcacca tttgttttaa 780

tgttcttgca ttactctaat ttatttatga ataataagct aaactaattg agtttatgtt 840

gatgtaactg acctgagttg gcagtgatgt ttggctactt gaatttaaaa caagattaag 900

acttgtgagt tggcagtaat tgtttggata cttgaattta gaacaagaat aaaacaagat 960

taattaagga tacattattc ctaacccgga ccctaattct atagattgat tattaaattt 1020

ttcttggacc aaccgtcacc gtgacctgtt catgatggtg atggcaaaag ccataataca 1080

cttgatttct gttttcaatt tttaaggttc ttattattat acttattata tactttgaaa 1140

attatgggtc aaaattttaa tatttgttat tccttccgta tgtttgactc aacttggagt 1200

tcatgaaaaa aaaaaaaaat ttttttaaac ttgtggtctt aaacaagtca tcgatatatg 1260

tgtggttgtg aatcgcctcg ttaggataaa gtagaaattt taaagttaaa ctatttcgaa 1320

ataaaaaagt atgatagtgt ttttgggaca tactaaaaag gaaataacac ataaaatgga 1380

acaaagaagt atattttagt gatttttcac atatatatca gtattttgta tcaaaaatgc 1440

tggttcagtt gaactcattg aactgggtgc tccatccacc tccgagtact gcaacatgtg 1500

accggtggca gatgcaaccc ttacgtacca gggtcatctg aacctagtat aaatatattt 1560

gtgaaaaatc cctaaaattt caataattag tagatttaaa accttaattt taaaactaca 1620

atgagttcag ttttaaaatc tttatatgtc aaacctatca agattaaatc ctggatccac 1680

cttttgcatg tgacagtaca atagcctttt gtaattgaaa caaatatttg aattttggta 1740

actatttgat cacataggtt gaagcatcgt ggaccagatt ggagtgggat atatcaacat 1800

ggtgattttt acttagcaca tcaacgttta gcaattatcg atcctgcttc tggtgatcag 1860

cctctgttta atcaagataa gacgattgtt gttacagtga gtgcctctaa tttacctctt 1920

tttttttct ttttttttt acgatcgcgt tgtttagatt atttatggat gaaaatttgt 1980

atatttgatt attgattgtg tgctaaattt tgcaggtcaa tggagagatt tacaatcatg 2040

agaaacttcg taatcttatg cctaatcaca agttcagaac tggaagtgat tgtgatgtta 2100

ttgcacatct tgtgagttag tttacttttc tcattgacca acttaggcca gtgaattata 2160

ttaggaattt cgggtgtttg gatatggtca aattagctta taagcactta ttatcaattt 2220

taacattttt atccatacac gtaactgttc attcataaag tcattttagc acttgatgct 2280

catcaaccta tgttgttggg actcttcgaa aatgtcagcc cgatagcatt tcggagagtc 2340

cgagcaacat agcaatcaac tacttttaat cagttaaacg aacatgctca tagtgataac 2400

ctctggaaaa tatgttatag taaattagaa aaatttatac gatgtctcac tatcggtatg 2460

tattgatcag tatgaagaat atggagaaaa ttttgtggac atgttggatg gggtgttctc 2520

ttttgtattg ttggatacgc gcgataacag ctttcttgct gctcgtgatg caattggaat 2580

tactcccta tatattggtt ggggacttga tggtaagatt ttctatacaa ttttccagtt 2640

agaaattaaa actgaagcta ttcctattta ctattgaaga atcttgatac atgttatttg 2700

gtatttcgtc gtgttgttat gtctcaggct ctgtgtggat ttcatctgag ctaaaaggat 2760

taaatggtga ctgtgaacat tttgaagttt tccctcccgg tcacttgtac tcgagcaaga 2820

atggcgggtt taggagatgg tacaatcctc aatggttctc tgaggctatt ccatcaaatc 2880

cttacgaccc cttagttttg agacgtgcct tcgaaaatgt gaggcttgtt aatgaatcta 2940

gtgtacaatc ttggatgttt ttctctcgac tttggtttta gcactcaaaa agttgtctgt 3000

acaaacgatc ttggctataa ggagtggtgg ttaattttgc aggctgttat caaacgattg 3060

atgaccgatg tcccctttgg tgttctgctc tccgggggac ttgattcgtc tttggttgct 3120

tctgtcactg ctcgctactt ggctggaaca aaagctgcta agcaatgggg agcacagctt 3180

cattccttct gtgttggtct cgaggtcaga ctatcaatcc tgagcggaga catatttggg 3240

gcgggttctg tgggttcaac tgaacccatt gcttttggtt cgaaccatat atacaaatcc 3300

aagaaaatat aagatgtgta catataatat gacactcatt ctgagcctac tgacgctaga 3360

tactggactc gcctttggtc ttgagacttt ataatagaaa atagatattc aataccaatt 3420

tctgtttttc ttttctgact gacagggctc accagatctc aaggctgcaa gagaagttgc 3480

tgactatttg ggaaccgttc accacgagtt caccttcaca gttcaggttt gtaaatcgtg 3540

ttgctactcc gatttattca tgtgagtctc ttctgttttc ctcctagaaa gcaacaagtg 3600

ttcatgtttt gcaggatgga attgatgcta ttgaagatgt tatttaccat atcgagacat 3660

acgatgtaac aacgatcaga gcaagcactc ctatgttcct tatgtcgcgt aagattaaat 3720

cactgggagt taagatggtc atatcagggg aaggctcaga tgaactgttt ggcggctatt 3780

tgtacttcca caaggctccg aacaaggaag aattccatgt ggagacatgt cacaaggtaa 3840

taaaacacgt cggctccctt ggcaagtctg attctccttg tcattgtttg tctcgggttg 3900

gaataaattg ctataattcg agaagaaatg ttaatcctgc tctttcactc gcatgcagat 3960

aaaagcgctt caccaatacg actgtttgag agcaaataag gcaacatcag catggggctt 4020

agaagctaga gtaccatttc tggataaaga gttcatcaac gttgctatga gtatcgatcc 4080

tgaatggaag atggtaacaa aactgagctc caattgtcaa tgagatgaga agcataactg 4140

aatatgcacg ttctctaaaa cttgtttttc atccgtttca gattaaacac gatcatggta 4200

ggatcgagaa gtgggttctt aggaaggctt ttgatgatga ggagcaaccc tatctcccaa 4260

aggtccacaa agtcatgttt ttcctactga tttgccgatt agtatggatc aaaactaaca 4320

tgttttgttc ttttatgtac tctgcagcat attctgtacc ggcagaaaga acaattcagt 4380

gatggcgtag gctatagttg gatcgatgga ctcaaagcac atgctgaaca acatgtgagc 4440

ttctaaataa atccagaact attacatcgt tatcgtccaa ttttcgtttg ttttgctgtc 4500

agctgatctt ggaaacaatt cttttctctc aggtgactga taggatgatg cttaatgctg 4560

cacatatctt ccctcacaac actccaacta caaaggaagc atactattac aggatgattt 4620

tcgagaggtt cttcccacag gtacttatag cgcgagacta gaatcatata tctcttaaat 4680

ggaaacatga aaaataaagg aggtgttttt tctccttgga aaaagtattt actactgatt 4740

aaagcacctt cattcaccca tcttgctact tcgcgtactt tactaagttg tggttctaaa 4800

aaagaagatt tagcttggta tattccatca cgaggaagcc acaaaaagat tctacttata 4860

agaagttgga tacttttaat ggtgtgagac cttttgggaa aaaccatgcg ggcttggccc 4920

aaagccgaca atatcacacc atgttaagag tatctttgct tcgttttagc caaacagtac 4980

aataagtcaa tttttaaacc atgttgttac tattgttgga tttgcagaat tcagcaaggc 5040

taactgttcc tggaggaccg agtatagctt gcagcacagc taaagctatt gagtgggatg 5100

cttcgtggtc gaacaacctt gatccttccg gtagggctgc aatcggtgta cataactcgg 5160

cttatgacga tcatctcccc gatgttggta atgggaattt ggacacaacg atcatcgata 5220

atgtgccgag gatggtagga gtgggtgctg ctgcagagct cacaataagg agctag 5276

<210> 6

<211> 590

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 6

Met Cys Gly Ile Leu Ala Leu Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Gln Ala

1 5 10 15

Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly

20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Ile Tyr Gln His Gly Asp Phe Tyr Leu Ala His

35 40 45

Gln Arg Leu Ala Ile Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Gln Pro Leu Phe

50 55 60

Asn Gln Asp Lys Thr Ile Val Val Thr Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn

65 70 75 80

His Glu Lys Leu Arg Asn Leu Met Pro Asn His Lys Phe Arg Thr Gly

85 90 95

Ser Asp Cys Asp Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Glu Tyr Gly Glu Asn

100 105 110

Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Val Phe Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr

115 120 125

Arg Asp Asn Ser Phe Leu Ala Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Pro

130 135 140

Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val Trp Ile Ser Ser Glu

145 150 155 160

Leu Lys Gly Leu Asn Gly Asp Cys Glu His Phe Glu Val Phe Pro Pro

165 170 175

Gly His Leu Tyr Ser Ser Lys Asn Gly Gly Phe Arg Arg Trp Tyr Asn

180 185 190

Pro Gln Trp Phe Ser Glu Ala Ile Pro Ser Asn Pro Tyr Asp Pro Leu

195 200 205

Val Leu Arg Arg Ala Phe Glu Asn Ala Val Ile Lys Arg Leu Met Thr

210 215 220

Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser Leu

225 230 235 240

Val Ala Ser Val Thr Ala Arg Tyr Leu Ala Gly Thr Lys Ala Ala Lys
245 250 255

Gln Trp Gly Ala Gln Leu His Ser Phe Cys Val Gly Leu Glu Gly Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Lys Ala Ala Arg Glu Val Ala Asp Tyr Leu Gly Thr Val
275 280 285

His His Glu Phe Thr Phe Thr Val Gln Asp Gly Ile Asp Ala Ile Glu
290 295 300

Asp Val Ile Tyr His Ile Glu Thr Tyr Asp Val Thr Thr Ile Arg Ala
305 310 315 320

Ser Thr Pro Met Phe Leu Met Ser Arg Lys Ile Lys Ser Leu Gly Val
325 330 335

Lys Met Val Ile Ser Gly Glu Gly Ser Asp Glu Leu Phe Gly Gly Tyr
340 345 350

Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys Glu Glu Phe His Val Glu Thr
355 360 365

Cys His Lys Ile Lys Ala Leu His Gln Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn

370 375 380

Lys Ala Thr Ser Ala Trp Gly Leu Glu Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp
385 390 395 400

Lys Glu Phe Ile Asn Val Ala Met Ser Ile Asp Pro Glu Trp Lys Met
405 410 415

Ile Lys His Asp His Gly Arg Ile Glu Lys Trp Val Leu Arg Lys Ala
420 425 430

Phe Asp Asp Glu Glu Gln Pro Tyr Leu Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg
435 440 445

Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly
450 455 460

Leu Lys Ala His Ala Glu Gln His Val Thr Asp Arg Met Met Leu Asn
465 470 475 480

Ala Ala His Ile Phe Pro His Asn Thr Pro Thr Thr Lys Glu Ala Tyr
485 490 495

Tyr Tyr Arg Met Ile Phe Glu Arg Phe Phe Pro Gln Asn Ser Ala Arg
500 505 510

Leu Thr Val Pro Gly Gly Pro Ser Ile Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala

515 520 525

Ile Glu Trp Asp Ala Ser Trp Ser Asn Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg

530 535 540

Ala Ala Ile Gly Val His Asn Ser Ala Tyr Asp Asp His Leu Pro Asp

545 550 555 560

Val Gly Asn Gly Asn Leu Asp Thr Thr Ile Ile Asp Asn Val Pro Arg

565 570 575

Met Val Gly Val Gly Ala Ala Ala Glu Leu Thr Ile Arg Ser

580 585 590

<210> 7

<211> 5926

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 7

atgacgtagt ttagcttgtt cgtccacggc ataaaaacgc ctataaattc ggtggtcatt 60

ttggttcatt tacagaatcc cacgatcatc ttttgtgtat tatcattttg ccttctttac 120

gtgttcttct ctcccaaaat cctgcaaatc tttaactatc ttcccatatt tctctccctc 180

tttctctttc tttttgttat ctactttact acttctatta gtagagcttt atccaattaa 240

agtcatctat attggatata gtttttacta ctactttatc ttgtttggga aagaaaagaa 300

taaaaaatta gagtgtctat attaagtata aaaaggtgaa aaataaaaaa gtagtgatca 360

atcatgtgtg ggatcttggc tttgttgggt tgtccagatg attctcaagc caaaagggtt 420

cgagttcttg agctctctcg caggcaattc ccctttcttt tctcttttat tttattactc 480

catcatatta ttcaactata atttcacctt ttttgttttt caattaatat ttgtctgctt 540

ttgctttctt catttaatgt tcttgcattg ctctagttcc tttatgaata ataggctaaa 600

gtaatagagt gaaggagtag agtcggagca acggtgaagc tgtctttaca tgatctatag 660

ctcacgggtt caccatagaa gcagccaatg gcgaagctag aaaattcaat aagggtgttc 720

tttcctttgc cagtgggcta tgcaagggtg ttcaaagtct atttttaatc aataacaagt 780

aatattttat cttatagtga aagcaaccac taatacttgc atttaggtaa ttagctgtct 840

atcaagggaa gttatgtgtg gtaagtagtg gcggagccag aattttcgtt aaggggtgtc 900

aaaatatata aaagtaaaca taccaggaaa ttaaggggag tcaatacata gtatatatac 960

atataattta ttttttacc tagctataca gtatattttt tccgcgaagt gacacccctt 1020

cctataaggt ggctccgcca ctggtggtaa gggtggtcaa ttgaacaccc ttcgccgaaa 1080

aattatactc tggatggtgt aaaatattac tacttgttac tgattcaata aataaatttt 1140

gaaaaccctt gcatagtcta gtagcaaaga gtgttcaaaa ttttgaacac atttattgaa 1200

ttctctggtt tcgccactgc tgtctacatc acatccctta aggtgcgatc ttttttcgaa 1260

tcatgtgtga atacgggatg ccttgtgttc caggctgccc ctttaggcta aagtaataga 1320

gtacgtctta attcttatgt tgatcatata cctgaaactc ggaactggca cgagagatat 1380

aaattcagaa tttatagcaa atttatcatt atgttgcatt tgttttaatg ttcttgcatt 1440

actctaattt ttttatgaat aataagctaa actaattgag tttatgttga tgtaactgac 1500

ctgagtttgg ctacttgaaa gttaaaaacaa gattaagact tgtgagttgg cagcgattgt 1560

ttggatactt gaacacgttt aaaacaagat taagacatta tgatggatac attattccta 1620

acctgggtgg gacctaattc tatggattca ttattaaaat ttcttggaca aaccatcacc 1680

atgatctgtt catgatgttt atggcaaaag ccataataca ctttatttct gtatcacaac 1740

tactttatac acatgttata gagttttaaa attatttaa tatttgttat tccttgagtc 1800

tcctgatatt tgactccgca tgaaattcaa gaaaaaaaaa agaagatttt taaaatttat 1860

agtcgaaaac aagccatcga tatatgtgtg gttgttaata acctcgttag gcgtaaagta 1920

gaaattttaa agttaaacta tttctaaata agaaaatatg atattgtttt tgcatagact 1980

aataaggaaa gtatgacaag taaaataaaa caaagaagta tattttaatg attttttccg 2040

tgtcaaaaat gtcagtttag ttgaacttga actcattgaa actggtgacc agtggtggat 2100

gcaaacctta ggtacggagg tcatccgaac ctagtatagt tatatttgtg aaaaatcact 2160

aaaatttcaa taattactag atatgaaacc ttaatttaa aactacaatg agtgcagttt 2220

taaaatcttt aaatgtcaaa ccgatcaaga ttaaattatg gatccacctt taaatgtcaa 2280

accgacagta caatagcctt ttgcaattga aacaaatata aacattacat ttattaaact 2340

agttttaatt ttggttacta tttgattaca taggttgaag catcgtggac cagattggag 2400

tgggatatat caacatggtg atttttactt agcacatcaa cgtttagcaa ttatcgatcc 2460

tacttctggt gatcagcctc tgtttaatca agataagact attgttgtta cagtgagtgc 2520

ctctaattta ccctttttt tgtggacgaa tgcgttgttt agattacttt aattatggct 2580

gaaaatttgt atatttgatt attgattgtg tgccaaatgt tgcaggtcaa tggagaaatt 2640

tacaatcatg agaaacttcg taatcttatg cctaatcaca agttcagaac cggaagtgat 2700

tgtgatgtta ttgcacatct tgtgagttag tttactttac tcatcaacca acttaggcta 2760

gtgaattcaa aggcggagct agaattttga gtatatgagt tctggaattt aggacaagat 2820

aagttactgg gttcggatag attatttaga catattaagt agatttctta acacaaatac 2880

acggcccgag ccgaagctat tgggttctgc cgaacccgta gctagacttg tagctccgcc 2940

attgagtgaa ttatataagg aatttcgggt gtttgggtaa acttataagc tggtcaaatt 3000

agcttataag cacttattat caatttcaac atttctatcc aaacacgtaa ctattcattc 3060

gattttagca cttgatgctt atcgactact tttaatcagt taaacgaaca ggctcatagt 3120

gacaaactct agaaaatatg gtattgtaaa ttagtagaag aatttatacg atgtctcact 3180

atcgatatgt attgatcagt atgaagaata tggagaaaat tttgtggaca tgttggatgg 3240

ggtgttctct tttgtattgt tggatacgcg cgataacagc tttcttgctg ctcgtgatgc 3300

gattggaatt actcccctct atattggttg gggacttgat ggtaagattt tctatacaat 3360

tttccaagta gaaattaaaa ctgaagccat tccaatttgc tattgtagaa tcttgatata 3420

tgttatttgg tatttcaggc tctgtgtgga tttcatctga gttaaagggc ttaaatgatg 3480

attgtgaaca ttttgaagtt ttccctcccg ggcacttgta ctcgagcaag aatggcgggt 3540

ttaggagatg gtacaatcct caatggttct ctgaggctgt tccatcaaat ccttatgacc 3600

ccttagttct gaggcgtgcc ttcgaaaatg tgagaaatga atctaggagg tttccctctc 3660

gactttggac ttagcactct aaaaatttgt ctgtacaaac gatcttggct ataaggagtg 3720

gttgttaatt tcgcaggctg ttattaaacg gttgatgacc gatgtaccct ttggtgttct 3780

gctctccggg ggacttgatt cgtctttggt tgcttctgtc actgctcgct acttggctgg 3840

aacaaaagct gctaagcaat ggggagcgca gcttcattcc ttctgtgttg gtctcgaggt 3900

cagtcaatca atcttgagta gaaaaaattt agggtcggtt ctgtgggttt aacttaactc 3960

attgcttttg gctcgaacca tatatgcaaa tccaaaaaga tttaagatgt atacatataa 4020

tataacactc attctgagcc tactgacgct agatactgga ctgtgccttt ggtcttgaga 4080

cttttgtaat agaaaattga tattcaatac caatttctgt tcttttgtga ctaacagggc 4140

tcaccagatc tcaaggctgc aagagaagtt gctgactatt tgggaaccgt tcaccacgag 4200

ttcaccttca cagttcaggt ttgtaaatcg cgatgctact tcaatttatt catgtgaggc 4260

tcttctgttt tcctactaga aagcaacatg tgtgcatgtt ttggcaggac ggaattgatg 4320

ctattgaaga tgttatttac catatcgaga cgtatgatgt aacaacgatc agagcaagca 4380

cccctatgtt ccttatgtcg cgtaagatta aatcacttgg agtgaagatg gtcatatcag 4440

gggaaggctc agatgaactg tttggtggct acttgtactt ccacaaggct cccaacaagg 4500

aagaattcca cacggagaca tgtcacaagg taataaaaca catcggcaag tctgattctc 4560

cttgtcattg tttgtctcgg gttggaataa attgctataa ttcgagatat ggaatgagtt 4620

aagaaatgtt aatcatgttt ttccattcgc atgcagataa aagcgcttca ccaatacgac 4680

tgtttgagag caaataaggc aacatcagca tggggcttag aagctagagt accatttctg 4740

gataaagagt tcatcaatat tgctatgagt atcgatcctg aatggaagat ggtaagaaaa 4800

ctgagctcca attgtcaatg agacgagaag cataactgaa tatgcgcgtt ctctaaaacc 4860

tgtttttcat ccgtttcaga ttaaacacga tcaaggtagg atcgagaagt gggttcttag 4920

gaaggctttt gatgatgagg agcaccccta tctcccaaag gtccacaaac tcatattttt 4980

cctactgatt tgccaataat tatggatcaa aactaacatg tttgttctgt tatgtgctct 5040

gcagcatatt ttgtaccggc agaaagaaca attcagcgat ggtgtaggct atagttggat 5100

cgatgggctc aaagcacatg ctgaacaaca tgtgagcttc cttaataaat ccagaactaa 5160

tgcagcgtta tcgtccaatt tttgtttgtt ttactatcaa ctaattttag tcatgttagt 5220

atgtttacct taggtactat gtttttaagg agtttttagt cgtgtcaaga atttattcgc 5280

tggtaaaaaa tagattgaac ttccagtatt ttctactttt attatgcata tgattggact 5340

gagatgaggt taaatggaac aacatggttg aggattaata taaccaattc caacttggtt 5400

ggaattgagg cgtcgtagtt gttgttagat ctcagaaaca attcttttct ctcaggtgac 5460

tgataggatg atgcttaatg cttcacatat cttccctcac aacactccaa ctacaaagga 5520

agcatactat tacaggatga tttttgagag gttctttcca caggtaatat tagtgagaga 5580

ttaaaatcta tagattttgt ttatggctga ggtttaaatc atagatttct taagctcaaa 5640

aactaaaacc atgtccctgc tactgttgga tttgcagaat tcagcaaggc taactgttcc 5700

tggaggaccg agtatagctt gcagcacggc taaagctatt gagtgggacg cttcttggtc 5760

gaacaacctt gatccttccg gtagggctgc tatcggtgta cataactcag cttatgacga 5820

tcatctaccc gatgttagta atgggaattt ggacacaacg atcatcgata atgtgccaag 5880

gatggtagga gtgggtgctt ctgcagagct cacaataagg agctag 5926

<210> 8

<211> 565

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 8

Met Thr Leu Lys His Arg Gly Pro Asp Trp Ser Gly Ile Tyr Gln His

1 5 10 15

Gly Asp Phe Tyr Leu Ala His Gln Arg Leu Ala Ile Ile Asp Pro Thr

20 25 30

Ser Gly Asp Gln Pro Leu Phe Asn Gln Asp Lys Thr Ile Val Val Thr

35 40 45

Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn His Glu Lys Leu Arg Asn Leu Met Pro

50 55 60

Asn His Lys Phe Arg Thr Gly Ser Asp Cys Asp Val Ile Ala His Leu
65 70 75 80

Tyr Glu Glu Tyr Gly Glu Asn Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Val Phe
85 90 95

Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr Arg Asp Asn Ser Phe Leu Ala Ala Arg
100 105 110

Asp Ala Ile Gly Ile Thr Pro Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Leu Asp Gly
115 120 125

Ser Val Trp Ile Ser Ser Glu Leu Lys Gly Leu Asn Asp Asp Cys Glu
130 135 140

His Phe Glu Val Phe Pro Pro Gly His Leu Tyr Ser Ser Lys Asn Gly
145 150 155 160

Gly Phe Arg Arg Trp Tyr Asn Pro Gln Trp Phe Ser Glu Ala Val Pro
165 170 175

Ser Asn Pro Tyr Asp Pro Leu Val Leu Arg Arg Ala Phe Glu Asn Ala
180 185 190

Val Ile Lys Arg Leu Met Thr Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser
195 200 205

Gly Gly Leu Asp Ser Ser Leu Val Ala Ser Val Thr Ala Arg Tyr Leu

210 215 220

Ala Gly Thr Lys Ala Ala Lys Gln Trp Gly Ala Gln Leu His Ser Phe

225 230 235 240

Cys Val Gly Leu Glu Gly Ser Pro Asp Leu Lys Ala Ala Arg Glu Val

245 250 255

Ala Asp Tyr Leu Gly Thr Val His His Glu Phe Thr Phe Thr Val Gln

260 265 270

Asp Gly Ile Asp Ala Ile Glu Asp Val Ile Tyr His Ile Glu Thr Tyr

275 280 285

Asp Val Thr Thr Ile Arg Ala Ser Thr Pro Met Phe Leu Met Ser Arg

290 295 300

Lys Ile Lys Ser Leu Gly Val Lys Met Val Ile Ser Gly Glu Gly Ser

305 310 315 320

Asp Glu Leu Phe Gly Gly Tyr Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys

325 330 335

Glu Glu Phe His Thr Glu Thr Cys His Lys Ile Lys Ala Leu His Gln

340 345 350

Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn Lys Ala Thr Ser Ala Trp Gly Leu Glu
355 360 365

Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp Lys Glu Phe Ile Asn Ile Ala Met Ser
370 375 380

Ile Asp Pro Glu Trp Lys Met Ile Lys His Asp Gln Gly Arg Ile Glu
385 390 395 400

Lys Trp Val Leu Arg Lys Ala Phe Asp Asp Glu Glu His Pro Tyr Leu
405 410 415

Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val
420 425 430

Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly Leu Lys Ala His Ala Glu Gln His Val
435 440 445

Thr Asp Arg Met Met Leu Asn Ala Ser His Ile Phe Pro His Asn Thr
450 455 460

Pro Thr Thr Lys Glu Ala Tyr Tyr Tyr Arg Met Ile Phe Glu Arg Phe
465 470 475 480

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

Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala Ile Glu Trp Asp Ala Ser Trp Ser Asn
500 505 510

Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg Ala Ala Ile Gly Val His Asn Ser Ala
515 520 525

Tyr Asp Asp His Leu Pro Asp Val Ser Asn Gly Asn Leu Asp Thr Thr
530 535 540

Ile Ile Asp Asn Val Pro Arg Met Val Gly Val Gly Ala Ser Ala Glu
545 550 555 560

Leu Thr Ile Arg Ser
565

<210> 9
<211> 21008
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> misc_dấu hiệu
<222> (18072)..(18072)
<223> n là a, c, g, hoặc t
<220>
<221> misc_dấu hiệu

<222> (19355)..(19462)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_dấu hiệu

<222> (19541)..(19541)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_dấu hiệu

<222> (19714)..(19786)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<220>

<221> misc_dấu hiệu

<222> (20035)..(20035)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 9

atgtgtggaa tactagctgt ttttggttgc attgataact ctcaggccaa gcgttcccga 60

atcatcgaac tttccagaag gtttcttctt tttattgctt tccgattttc tacagcattc 120

ttattcttct ggggtgtcaa tggtatgcat gtgttttgga tttgctattc gtgaacttgt 180

tcgctttctc gtggtcttcg atttattttt gtcaatttat aatcagcgtt ttttgtatgg 240

atttctcttt tgaatctctc aaatatatga catttgattt cctcgagaaa atttggcatt 300

tttatggttc ttatgatatg tggttaaccc ctcgctctgc atcgcttcag cgctttaaaa 360

cacgaagtga tggctattag taatactgct agagtggtta ttgaattaca ttaaataacg 420

ggttgctagt agatcaaatt cagaatgaca gtgaaatatc tctggaaact tgaatccccg 480

ttcgattcgc tggtaaaacc tggctaaaaa atagctttat ctcaaaggag agtatgtcac 540

tgtgaaattg gtggtatgtg ttgtttaagg catgatatgc tgctcttagg tgatgtcaag 600

atgataatac catccttttc acactagact cagctttgta gcacttacat ctcagttaat 660

cgatggagga aaatctagtc tgctttgggg catattatac caaatgtctt ccttttgttt 720

tctagtgttg tttctcaaga attgaaaaac caatctacaa tatagtgata taattaacta 780

gttaactctt cctgtgtttt ctgaaaattt ccaataattg agaagtgttt actggtcaat 840

tagtaaaggg agaacggaat atttttttcc tctaaagaac ttctcttttt ccatacagaa 900

tgactttcta tacaaggcct aagtctaatt tagtgtctgc gattaagcat cttctgggaa 960

cttcacactt gaaagaagta gaactaggag ggggcaggtc tagaaagata attgcttcag 1020

tcatttctca taaaaaacat tgcttcagtc attatgtgca ttcatataga gttggtcaag 1080

ctgctaagct gagctaatag tatgatagct gtgactctcg acaaagtagg ttgcctctta 1140

gggctttatc ctttggctcc gtaaagaatt tctttgggag ggctccagag tgggtaggat 1200

tgttctcatg gtaagctgta acaccaacga aacaagcctt tgtagctgtg gaagtccgag 1260

ggggtggtgg tggtggtggt ggtgtgagag ttagagtggt ggaggagagg ggaggagtga 1320

agagaagttt atattttaaa gaatagggcc ttgagaactt ttagtagtga gcatgcatta 1380

ttattattgt tattgttatt attattatta ttattattat tattattata ttattattat 1440

tattatatta ttgttatgta attacttagc taatgaggtt tttccaactg tttccaaatt 1500

aggaaatgtg ttgaaagcat agttaagtat ataaaagcgt gttctttcta atatccttag 1560

cttttagagc agataatcac aaaatttatc atgataatat agcagacaat ttttcctagt 1620

tcaaatctca tgccaccctt cataaaaaat ttccacgtgc ttggctggca tgttagggga 1680

cgtcttggca taattaaaca aatagaattg tccctttcta acagcttaag cttttagatg 1740

aggcggtcaa caattcaaca atttgcattt gtttgataag aagatattaa aagaacctta 1800

aaaggtgtca gtatgtgaac aaactcaagg ggtagactaa ctagaagtca atttaaattt 1860

tctgcttgtc tgtgttttac ttcttttgca ctatagaaat tgcatttcca gcattccgaa 1920

agctgcttcc tttgcatata gacttcacat ttccagcgtt tctgataagc gttcttgctt 1980

attcctgtcc ttctacttgg ttgattctcc tctcacttag ttcactatct tcttgcacgc 2040

attttcaaat tgttttatca attctcttgc tttcttttca tctgacccca caaaatacct 2100

cccaaaagcc tttctgcttt tccgagtctg aaattatctg cttattactg cctttcaagt 2160

attctgatgc gttgactgtt tttttccctt gtagtaatgc atggttcgct gtccaatctc 2220

tattttgttt tttgtgaacc actattcttt gttgcttctg tttcgtcatc ctcagttccc 2280

catcttctca gtttgatttt cctcatttaa aaagcgtgtg ccccttttct tgtgctaccc 2340

tctaaaaaat cagttgctgt catctcgttt gatctgtcat gatcccagtt gatgccacat 2400

gtttagttct ttacctctgg acaactttta cttcctgaga accacgattt cttttcctga 2460

agaaattctt agaaattggt tatgtaaagg aaattcccag caatcaccat ttggcctcta 2520

cctggcttgc ttttcaactt accgacacgt gttcatcccc ttttaacaga tgctgaccat 2580

tatcttctgc ttgttggggc atacttctta cccatggtgt taaccctgat ctttcgtatc 2640

acatttttca actcttaatt ctcacatgta aagtgcctat ctttgcctct ttagttgatc 2700

ttgggttggg ctgttaatcc aaattctctg ggctttgctt tgaagtatga taagcggtag 2760

ctttactaca gtaccatatt ctacattgct acagacgtga aattatcctg atttgtcttt 2820

gatgtgatgt ctggcaagtg tagattacgc cacagaggac ctgattggag tggattgcat 2880

agccatgatg actgttatct tgctcatcaa cggttggcaa tagtagaccc aacttctgga 2940

gatcagccac tttacaacga ggacaagacc attgttgtcg cggtatggaa atatttatta 3000

tatttttct tagatattac cggtacatgg actttggaca atatttgtgc gttttgatct 3060

tctatagtac aaacttttct cgtaggataa atttcctcta ctttgaatgg atcttaacag 3120

gaaaatcgga ataaacaatt tgtgatttcg aaatttttag ttcttacata tttggaacat 3180

atgcggtaaa gtaactaggc gattgactag gtgaatacgg agaatttcct ctactgttat 3240

caatatttac tcagctcatt tgaaagatct ctgggtcgtc tagcagtaca gctatttagg 3300

caacttaacc aaatcccctt cccatgtgtt tcactttctt gacttatttt atattttgac 3360

attttgcaat gccgaaaata aattgttttt ccattttatg acctttaaaa tgttgaggtg 3420

aagggctagg cggtacttta attgacttat cagcaacaat gtattagata cagagcacaa 3480

acttgtttgg gtgcctaatt tggtattttt tgagaacgat ggagtaaatg gaaatatgaa 3540

ttagcaaaat attgaaatag tagatctgaa aaatgaatga ctgaatttag aggaggacct 3600

tttcttcttt ccttgctgaa gtggttataa gagaattatg tgaagaacat gtaagcttta 3660

gggtagtgtt acaccataac agtcatgctt tccctcaact attagtgtag ctgatgaatg 3720

ctttcagaaa tgtggctgtt tttttgctgc gtattttatg tctttcatca tctcaaaatt 3780

tattgtgttt taacactgct tggaaggcct agagtcttcc gaaaatagta ggttgagaaa 3840

acatgagtaa gcaaatttct tcctgctggc aattaatcgt tttatatgag gtgaagccac 3900

acaatctaac atggtcttag acataaaaat attatttttg acatagagca gacagaaatc 3960

ttgggtctag ttgctatctc ccttcctaat aagatgccct ctatcctcat tgctatatcc 4020

caaaacagat tcacactaga atgaataaat ctctccttgc agccacattt atattaataa 4080

gtagtgtaac accaaaacat ttgtgcttct gcaaagtctg ttgaagtgga cgattaagta 4140

ataaattgtg tgagtttgac tgaagagaaa gtaataaatt gggtgagctt ctcacatttt 4200

tcaggataat gtcaattcat ctgattgaac tttttgaagg acatctcctt ttctaaaagt 4260

ttttgttcac ttcctgaaaa tggttgcttt cccaaattta ttctcctgta ttttccttgt 4320

gctttttttt tttaccagga tgactctggc cttccctttt gcaaatagtg acttcattac 4380

cttttaacaa aagaccaaat agcctttgta tgcttgaaat cgaagcagaa tttacggctc 4440

aatttctcta ggagatgtgt agcagtaaca taaaacgtgg ttaaagcaac ttgtaagcac 4500

tgccactgtc caatttgaca tgactctatt actatttaga gtgtcaaata gtgtttcttt 4560

tgactaccaa tttttcaatt tctttttttat acctttttttc tttgactgtg acttatagta 4620

tattttatgt agtttcagaa tatatatttt agtttttaaa gaattgatgt ctgaaagtac 4680

agccaattag atggtttcac cctcgtactt taaatcttat aagttgtctt aggttaaagg 4740

aataatatgc atgattacat tgtttggatt gatattcaga agatcaaatg tgccggacaa 4800

aagcttgcag aagatataat tctgtcattt tgttgtttag ataaactacc cttgtcaaat 4860

acctaaaact aattcatact tttcaggatc cttcttgatt ggactactct gatcttcttc 4920

catatattga tatcctattc tttttgcttt taggttaacg gggagatata taaccataga 4980

gacttacggg aaaagctgaa gtcccaccag tttcgaactg gcagtgactg tgaagttatt 5040

gcacatcttg taagtacttt cagaatatat ttagataact atacatgact tctcagtttc 5100

tgtgcgcaga atgatttcaa aataccatga ctcaaatttt tcatcaaaag cgaaaaaggt 5160

ggattgtagt aggagaatga gatttttttgt cataatttct ttcttatggt acttgaactc 5220

cgcaatctac ctatcgcagt atgaagacta tggagaagac ttcgttcaca tgttggatgg 5280

aatgttctcc tttgtgcttc ttgacacccg tgataaaagt ttcattgctg ctcgggatgc 5340

aattggcatt acacccctttt atatgggatg gggtcttgat ggtatgtaat tgttccattt 5400

cataattttt ggtatattgt ccttttaata aatagcccgt gagctatatg aagttccttt 5460

gttgtttcct tgtttttttat ttgactgatg tatctttgtt gttttgccta ctattagggg 5520

tgtcaatggt tcggttcggc cggttatttt ataaaatttg taccatacca atttttaggt 5580

tattctatta tgtataacca aaattagact ttttgaaacc gtcccaatca tgtcggtttc 5640

tcttcggtat cggtacggtt cggttaattt tcggtatttt ttaatatcat gtaaaattca 5700

ccagtagaag tagaattgca ataacataca ttcttttata ggacttagca aaactctcta 5760

gatattttta ctgtttaaag ggtgatgaat taaaaaaaaa gaaaagaaag atggctagaa 5820

tatagatcca tcaactatta tacaacagcg taaaagaaat caaacaaaga caaagaaaat 5880

attaatcaca cgagttgaaa gatataccaa ggtaggactc aagaataaag tctatagaag 5940

attaaatatt caaaaagata aatctaaatt atatgaaagg aaacatattc aattcattgt 6000

agtttgctac tcataatcgc tagaatactt tgtgtcttgc taataaagat acttgaaata 6060

atttagttta agtagaagta gcataatagg ttttatgaat tagtattttg agtttaatta 6120

cttgttggct tgtaataatt ttcataattc caaggctcaa agaaaattta ttgcattatt 6180

atttttaaac ttactaaata aatatatttt ctacatgtaa aatttattcg gtatggttct 6240

gtatttttttc ggtttatttt tataaaataa aaaacctacc ctaattatcg gtgcggttgt 6300

agatttatat aaaaacctac ggtttcttaa aaagaaagct aaaaatcggt tcggtgcggt 6360

acggttcggt cggtttagtc gattttcgaa tatccattga cacccctacc tactataatg 6420

ctggtctcat gctgttgtta caaacaaatg atgtataata gtgcatagta catgttttct 6480

tgccgctgta gatcaacaat gtaccaagaa catctgtctt agctagttca acctaatctt 6540

cagttatcta tcattccagt gaataacaca tatagagtta ggccgacatt acctaaggcc 6600

aactatacaa cattgtgagg tgcgactaag gaactctgaa cactgatcgg gagaaaaagc 6660

aacttatccg tgtttgtttt gaagtactat gaggaggcag caaccttgct ggatttatca 6720

cttgacagta aatgtcaatg gttgaggaac atttttaatg accggaggag aaacagagaa 6780

gagaagaaat aattgatttt aaaaaagcag aatagaaaat tttgtgaagt cgtatgttaa 6840

tttcaatgaa gaggatcaac aggtgcaata tttgacttgg cacctagcat gtagaagttt 6900

ctggttgggg ttgagcatgg taggcactgt tgcttttaca actgtcatta gagtcggaaa 6960

catattgtat tcttgaggga gcgttgctat ggataaaaaa ggcctatcta ctacttgata 7020

tttgggcatt cagaactagt tgtctaggag gaagaaaagg atttaaaatg gtgagtattg 7080

taggctttct ttgccgtcca ggatgcctgg gctagttccc tgaattggga tactggtgga 7140

ggatttcctg aaattgatca tggccctgat atgttagggg ataagaacat tgaaggatcg 7200

aaggaaggtg ccggcgctaa gttttgctag aaatgaacag ttccattatg gcttttgtca 7260

aagatgggaa tggaattggc cccaacttct aggcatctcc atccatcgtc aggtgaacta 7320

aagtaaggtt acactggtag aatttttcat tatttcatat taagtaaggt gaagccgtca 7380

acaatcattg cgtgagaagg aaccaggaac aaaatctaga agatgtctac taaagtgcta 7440

atagataatc tgcaaaattt agcacggtaa ggctagtgta gatctggttc aaattttaaa 7500

ttggtccaaa atgcgttaat aaatgtcggg cctcgttttg gtcccccgaa aggttgctaa 7560

ataaagactt gacaaagaaa caggtgaagg agaagcccaa acatttgaac aaactacacc 7620

tagcctaaac aaagtgattg tttgcgagga ggaaaagcga gcatgcggag agagcctcaa 7680

acacaaaaaa tggcctagtc ttgtaatgag tctagccaaa tcatgtaagc tccgactttc 7740

aagagagatc aacagaaaac ttcgtcaatc cggataaatc aagaaaatta tgataatgga 7800

aaggaggctg gacattctac tgccgacgca acccctggtt ttggagtcag tgagacaagt 7860

ggaactaaag aagaatatgg atcaaaagag tttatccagt tgacacctga tagactcact 7920

acatcagttt tcagttcaag aacatttcaa ttcttgctga taaagatagt tgccgataaa 7980

gataggcaaa ctgttaccta ccaatcaaag gaggttgttt caattgagtt agaggtatca 8040

aaggaggagc cagtatatat agagcaagtt ttgatgaagg gagttgcctc tatttgagac 8100

caccaggtac tcaagtgctt cccgtagttc ctaggcattt tatgatggat atgatagaga 8160

aatgtcttat tgacaagaat atactagggc tacagggata atagggttgg gaaggtgagg 8220

acttctttgg ttgctgtcag gaacttggaa acaaagggag aaaggggttg gaatcaaagg 8280

ttttgatttc gtttttgatt tataaggaaa taatgggtag tggatggagt cgaggatagg 8340

aaagaggttt accagttgca ccattgaata tgtaattaga gacactatcc tcttgttagg 8400

gaacacgact atcacaagca cgtaagggtg agtgaaagct ccgacatgga cgtggtttat 8460

tcgggtatgt tggcacgaag ccttcgtgtc taggtttggt gttgggttaa gtgcaactcc 8520

ttaggaaggc aaataaactt gggacagatt tgatagttgt cggaagttgc acaatgatga 8580

tattttcttt atccaaacgc tacgaatgat tgcacatata gtaactagag ttatttctca 8640

tttgagcttt tatatgtaag aatcaaataa aatgattgat gaaatgcatg aaagctcaaa 8700

tgagaaataa ctagttgtga gaatgcacgg gggaaaaata tattatattg attaaagtgt 8760

tgtacaaccc tatttagata cagtaattac ataataatag gtatctactt cccgatgtgg 8820

gacactagac atgactaact acttaacaat ccccctcaag ccggtgcata taaatcatat 8880

gtatcgagct tgttacagat gtaactaata cgagaaccag taagagactt agtgaaaata 8940

tctgctagct aatcattcga ctttacaaac tttgtaacaa tatctcttga gagtattttt 9000

tctctaacaa agtgacagtc gatctcaatg tgtttagtcc tttcatagaa caccggattt 9060

gacgcaatat gaagagcagc ttgattatca cacaccagtt ccatcttgct gatttctccg 9120

aacttcaact ccttgagcaa ctgcttgatc caaactagaa tcacacgttg ccacaaccat 9180

ggcccgatat tcggcttcgg cgctagatcg agcaactaca ttctgtttct tgctcttcca 9240

agagactaaa ttacctccta ctagaacaca atatccagac gtagaacgtc aatcagcagg 9300

taatcctgcc caatcagcat ctgtgtaccc aacaatctgc tcgtggcctc gatcctcaaa 9360

tcgtaaccct ttgcctggag ctgactttat ataccgaaga atgcgaacaa ctgcatccca 9420

gtgactatca cagggagaaa ccataaacta acttgcaaca ctcaccggaa aagaaatatt 9480

aggtctagtc actgtgtggt aatttaattt gccaaccaac ctcctctatc tcgtaggatc 9540

tctaagatgc tccccctgtc catgcagaag cttagcattc ggatccatag aagtgtcaac 9600

tggtctacaa cccatcattc cagtctcctc aagaatgtct aaggcatatt tccgctgtga 9660

aataacaata cctgagctag actgagcgac ctcaatacct agaaaatact tcaatctgcc 9720

cagatcctta gtctggaagt gctgaaagag atgctgcttc agattagtaa taccatcttg 9780

atcattgcca ataataataa tatcatcaac ataccactca actttggcat ttctatctca 9840

atttggctgg aatatcctgg acaatgccca ataacactgc gtctcttctc agtagctgga 9900

acaatggagg ggcaaatatt aaacagaaga aatggtggaa agtagttcct gcttgtatct 9960

ggtgggtcat gtggaaggaa aagaatgcag agtttttgaa gataggccta gctcttagcc 10020

tcttaccaga aaattaagct taattgtttt ttgttatttc atttttggtg caaagagagc 10080

tatagggagg atgtacattc tttactagat ttgctagaag aaatgtaatc gattagaata 10140

ggcaaggcag ttgcagatct tttggggtct gattgtggct tacactatct cctgtaaata 10200

tttttaatct tttatataat ttgttaccat tctaaaaaaa aacataaacc accagataaa 10260

tatacagatt aggagcagaa tgtcgataaa gcacagagtg atccgcttca ctacgagtca 10320

tgccgaactc ctgaataatt atgctgaact taccaaacca agctcgaggg aactgtttca 10380

aaccatatag tgacctgcgc aatcggcata caagaccact agacttccct taagcaacaa 10440

aaccaggtga ttgctccata taaatttctt cctcaagatc accgtggagg aaagcattct 10500

tagtgtctaa ctgataaaga ggtcattgac gtacaacaac catgaacaag aagagacaac 10560

cgatgctact ttagccacgg gagagagtgt cactataatc aagcccaaaa atctgagtgt 10620

atccttttgc aacaagacga gccttaagac gatcaacttg gccatccggg ctgactttga 10680

ctgcataaac ccaacgataa ccaacaatag acttacttga aggaagagga acaagcttcc 10740

aagtgccact cacatgtaaa gcagacatct cctcaatcat agtttgtcgc catcctggat 10800

gagatagtgc ctcacctgta gactttggga tagaaacaat tgacaaagat gatataaaag 10860

cataatgagg tgatgacaga cgatgataac ttaaatcgac ataatgagga ttaagattaa 10920

gagtggatca tacacctttc cgaagtgcaa tcggtgtact aggaagagac aagtccgcag 10980

taggagcagg gtcaagtgta ggatgtgaat cagttgggcc tgatgctggg tgcggacgac 11040

gatgatatgt caagagtggt gttccggtgg cggggaatct aggaggagcc acactagact 11100

ccccaacggt tggaatgggt aagacttatg tggcggaagg tgaaggagga gctatagtaa 11160

gctctttaaa ggtcggtata ggtaagacct cagatatatc aaggtggtca gaagaggtaa 11220

agaaaggttt agactcaaaa aatgtgacgt cagatgacat aaagtaatta cgaaaatcaa 11280

gtgagtaaca acgatatccc ttttgaacac gagaataacc aaggaagaca tacttgagag 11340

tacgaggagc taacttatct ttcctagggg ctaaattatg aacgaaacaa gagctcccca 11400

aaacacgagg aggaacagag tataagggtg actgggaaac aatactgcat acggaatctg 11460

attctggatg ggagatgaag gcattcgatt aaccaaataa caagctgtga gaactgtatc 11520

gcctaaaaaa cgcaacggaa catgagattc aaagagaagt gtgcgagcag tttcaatgat 11580

gtgcctattc tttctctctg caaccccatt ttgctgaggg gtataaggac aagaggtctg 11640

atgaataatt ccttgagaag tcataaagtg ctaaaattga gaggataact attctaaggc 11700

attatcactg cgaaaagtgc gaatagaaac accaaattga tttttaattt catcacaaaa 11760

attctggaat atagaaaaca actcagaacg atctttcatt aagaaaatcc aagtacatct 11820

tgaatgatca tcaatgaaac tatcaaacta acgaaatccc aaggttgagt tgactctact 11880

atgaccctat atatcagaat gaactaaaga aaaaacagac tatgcatgac tctcaatact 11940

acgaggaaag gaggctcagg tatgtttccc gagctgacat gactcacact ctaatgtaga 12000

taaactaggc actatcttct gaagcttgga tgtcctaaac atctgtgaat taggtccgga 12060

ggatctgtaa ctagacatgc cttggaggaa ttgagtgggt taaggtagta aaggccttct 12120

aattcaagtc ctgttccaat cgtctgtccg tactgcggtc ctgcataata aaagaatcat 12180

taataaaata tataccacaa tggagggcac aagtcaaacg actaacagat gcaagattaa 12240

aaggacaacc agggacataa agaacggaat ctagagtgac agagggtagg ggattcgctt 12300

gtccaactcc ttttgcttca gtttgagacc cgttggctaa agtaacagtg gaaagagact 12360

gtgaatacgc aatatttgac aaaagtgatt tattaccaga gatatgatca gaagcggttg 12420

agtccacaac ccattgtcca agagtactag actgggaaac acaagcaaaa gaattaccag 12480

caacaaaagc atcagtctga gcaacagagg ctacttgtgg agatgtctgc ttacttgctc 12540

gatactgaag gaacttatta tactcccctt ccgataaaga aaatacccgg ttacctatag 12600

tctcggtctg agcaacataa gcatttttgg gtggacgacc atgtaaagaa tagcacacgt 12660

cacgagtgtg tccaagttta tgacaataag agcacttggg tctagatctt ccaaaacgac 12720

ctcctcctcg tctattctcc atagtttgag atgcccgatt gttcacttac tgggatacga 12780

gaacagatga gtcaggtctc tgtgatgagc tcactgggtg acttggtgct gcagcaaggc 12840

gaagtaatcg agagaataat tcatcaactg tggggacagt cggactagcc aaaatctggt 12900

cacgtactga atcaaggtca ttagggagtc catcaagtgt aagaactaga aacatcttct 12960

gtcgttgctc ttgttgcttt ttaatactag cagaaactgg catcaacgtc tcaaattctt 13020

ccatgattgc ctgtacttgt cccctagtaa gtagacatat ccaattcctg tttcttcaag 13080

cttgtcattc gcgatattac atcatagaaa cgagatatgt cattagtgta taaattacga 13140

gccttttccc aaactaaata acatgtctgg aatggacgga acaagggcat caacttggaa 13200

tcaatagatc gccacaggat actacataac tgagcatcga ccttcttcaa aagtgttttg 13260

gccttttcat caccttcgct agccttttt gttaaatgat cttgaactcc ttgaccttta 13320

caacacaact cgacagacga agcccaagct aagtagtttg aacttctcat taaaggttct 13380

gaggtaatca taatagcaga acttccagaa ctcgtgtttt tagacccaaa tacatccact 13440

cccaaagaca ttattggatt gaaaagagat ctagcaaatt agcaccaaat aaaacaaaga 13500

atcaactgtg gttgcccaaa aactgccgga aaactactgt agttgccgga aaattttcaa 13560

agtgctcgga atcaaaaaat aaaaatatgg gcaggctcgg aatggtagag cgatcagact 13620

aacctaaagg agtttttctg aaaaaattga cggaacgggc tccatgcgct ggtgcgtgga 13680

gtagatctcg ccggagaaga ctgtctccga tcggcgcgtg gcggtgcgtg aggcggctta 13740

tgacggaggt gttcgctggg gtttggtcgc cggaagttgg gggaccttgt ggtggtgttg 13800

gtttttgcac aacaccgatg gaattggttt tgacgaaaaa tagccctaaa aggtcaccgg 13860

aattgaagca cggcgacggc tggtttttt tttccccgga tgttttctca ctgccgctct 13920

gataccatgt gagaatgcac gggagaaaaa tatattatat tgattaaagt gttgtacaac 13980

cctatttata tacagtaatt acataataat aggtatctac ttcccgatgt gggacactaa 14040

acatgactaa ctacttaaca ctagtaacct catggttctc atcctacttc attgaccact 14100

tggccacatc cttgggtgcc tgcactgtag ttgtagctgt aatgaagata gttttttttc 14160

ttttctggat actcttatat tgtgacaatt tttctctatt tgctgttaat ggatgaggtt 14220

atgtgactct ccggtggtga gaatgttaat gaacatcaag ctcacatgtc atttcatttt 14280

ctgattgatc ttgctcttca ctctttacga gtttaatgtg ttagtccttc caagttctgt 14340

ccatctatct ttctggtgtg cttaacccat gtatattgga ccacactttg tattcatgct 14400

gattgcaaca aagcctgact gatcctgaac tcctccttta tgccttaggt agaaattttg 14460

tgtgtttagt gttacatgtt tcgcttcaaa ggaaaaaggg agaaacttaa ggtagaatcc 14520

tgctccttga cctttggatc cttgcacatt gaagtggaca gacatgtttg ctttgctttg 14580

atgagttgtt ttagtagtcg gtctaaacaa ctgctgatgt attctgcttt attgtaagtg 14640

tctataattt ttatctttcc acaatttgct ttcagctctt tctgcatgta gagaaaataa 14700

cagaagcttc tatttgatca tgtaatattg actgcgcaag ttcagtttta aacaactttg 14760

gctatgcata tgcaagcaat gacctgaaat aaatattatt ttttatgcag ggtctgtatg 14820

gttttcttca gagatgaaag ccttaagtga tgactgtgaa cgatttgtta gtttccttcc 14880

cggtcacatt tattcaagca aaaatggtat gcccatacga agctcatttc tgagcttgtg 14940

cttcatttat gttgatagtt gatcatgttt cctatacgat cagcgtactt ttgctattta 15000

tttcagattt actttaggac cctgtcggaa acagtcttga aacccttatt gatggtgtaa 15060

ttgttatctc ttgatcaacc aaaggagtaa ttacatgtaa ttattacaaa tttgcaataa 15120

aataactttt aggataacca gtggagctta atgaatcttt taggatattt gggatgctag 15180

agtgatgtac ttttgataat gtcggttaat ataaaatcct ctgactttgt actgatgtac 15240

tggctgagca gattttatat tactttctag tccctctgca aataaaaaaa ttgtgagact 15300

gcaatataac accatttttt aatgcattta caatgtttaa acttgatgta gcagtgaaga 15360

acatgtcgac cttaaacaga ggttctattt gtcctagata aaggaacatc agcgtaatga 15420

aacattacag gagagaagct ctattgagtt tttgttaatc tagagggagc ccgtaaatag 15480

aacaccaatt catctgttat atgacttctt tttcattttg gaacgtttta aaagtttgac 15540

aacatttttt gatctccgta cactaaactt tttgatgtat taaactaact atttccacta 15600

ctttaatatt ttcttcctta aacaactcat gttagcatct taaactgtgt gtgttcaata 15660

ccctcataaa aaattaaacg agtatttttt tatatttgct tatgcccttg gagattggga 15720

tggggaagtt catcatttga ggtgaaaggt aaattctttt ggatggacaa aaagtgaacc 15780

tcgtctttgg catggaggga ctatttaaat cgtcatcatt accaaagtca tcctttcaaa 15840

tgtttacttt caagaactat tcatgctatt tctcaagtat attatgggtg caggaggact 15900

cagaagatgg tacaacccac catggtactc agaaaccatt ccttctactc catatgatca 15960

ccttgtctta cggaaagctt ttgagaaggt cattctattt tggatgtcgc ttgtttctga 16020

gttgtacata atatttaggt gccactttgt tatattttga acttcatcaa aagcctttgg 16080

ttttttgagg acacatatcc ccttgactga ctgggcgctg aatttccttg atgtattgtg 16140

cttattttga ttgtcctctt ctttgtaata ctcttgccta taaataaacc ttctttatca 16200

aaagaaaatg ataaaatgtt aataacactt tgtgatatat gttgaagggg agtcttggca 16260

taactggtaa agttgctgcc atgtgaccag gaggtcacgg gttcaagccg tggaaacagc 16320

ctcttgcaga aatgtagggt aaggctgcat acaatcgacc cttgtggtcc gacccttccc 16380

cggaccccgc gcataacggg agcttagtgc accgggctgt cctttttttt tgcatagact 16440

ttacatgata ttttatttca atctttatca attctttttt accttcacat gcaaattata 16500

ctaccgtatg tgaaatatgc aatagttttt cccgcaattt tcatctttca tgtacctctc 16560

tctactatcc ttgtattact actgatttgg tgcattagat gttaatttta ttcccaacct 16620

ttactttatg caggctgtag tcaagcgact tatgacggat gtaccatttg gtgtgcttct 16680

ctcaggtgga ctagattctt cacttgttgc tgcagtggcc aaccgttatt tggctgatac 16740

tgaagctgcg cgacaatggg gatcacagtt gcataccttt tgcgtaggct tgaaggtggt 16800

gatgctccct tttgtaaact tgctctgatt agggaattgc tagctgtatc atcccaattc 16860

acatggaagt tctagaccat tattgctgtt tcttttccat atatagggat tttctgaaaa 16920

tagtaaaaag gaaatggaat ttctcattat taaagatacc aaatgccttt ttgggaaatg 16980

atcttacagt tgaatctgaa atttcctttt gacattgtga ttaattctga tatgaatttg 17040

gtccatcctg gctttccttc tcttgattgt agatttttttt tctcttttg caattatatg 17100

cctttgtatt tcatatctct tattatgcta ttattttatt atgcattttt atggtactaa 17160

tatatcggct cctgttgctt tttttgagcc gagattttgt ttatttctgc tatcacgtcc 17220

tcctgaaaaa gtgctactat cttgtattca tgcgggagtt tgaaatttgc aagtgtataa 17280

ctttacaaaa tgattcgaac tgatcacagt tcattgctaa taaacttttta taaaaagcag 17340

gtattgttgt gatataatgt gacacttaaa taaatttaaa cctacatcct ttcgaaatct 17400

ctaatagctt cactaatatt tcttgtgcta aattcttcca acacctctta tcgatgccaa 17460

atttggcaga ccttagtgca attgaaagtg tttagtgttc tttatgcagt aggtatgtta 17520

ttgtccaaaa tgacagaaat aaagttagag atttgttgaa aagccacttg gtgtgattga 17580

gcagttcgga gatgagtgat ttatccatct ttttatactt ttagtgtttt gttttctttt 17640

atattgtttt ctcttttgct tttgtcattg taattaaggt tgtcttttgt ttgactttag 17700

ggttctcctg atctgaaagc tgccagagag gtggcagact accttggaac tcgtcaccat 17760

gagtttcact ttactgtgca ggtaactttc ttcataaaga catcctatgc tgatttttcct 17820

tataggagta taactgctta agtcaaattg gctatctact tctttctatt gctacatcag 17880

gaaggaattg atgcactaga tgaagtcatt tatcatgttg aaacatatga tgtgaccact 17940

atcagagcca gtacaccaat gtttctcatg tctcggaaga taaagtcctt gggtgtgaaa 18000

atggttctat ctggtgaagg ttctgatgaa atttttggcg gttatttata tttccacaag 18060

gcacccaaca antttacaca aaaatgacac aagttatgca gaaaaaatag tcctcaatgt 18120

catgggagac cagggttcaa atctgaggtt aaaaaaaata ctaggtgaac tcttctaatc 18180

cgtttaagcc ttggtagata gagttaacta gtatatgagc tagttagagc tagcaggtac 18240

ctggtagatt agtgcaggtg cacacgagct gactcaaaac caccattatt aaaaaataag 18300

aaagttttca atgttgttcc accgtgaatt catgatgtgc cgactttcct gtgtttatct 18360

ctggatagat gaagagtgtt tttggatctt gattaattct gtttggcccc tttgaggttc 18420

tgcaagctat ttctagactc aaacttgctg cgatctatgt taggtctaga gaatatctgc 18480

caaataaaac aatggaaggt acactcaagt attttatctc catattacaa gtcagtgtta 18540

gttgaatggg tctgatatat gggacagaaa atggcttcat acccataacc tcattaaaat 18600

gttgctgatg tgctgatctc atctgtacat ctagtataat cctaattaca aattaatgca 18660

tctctttgcg gtgactatag tatgctgaag aacttttctt gaaacattgc agatcagacc 18720

tgatctcgga agaatagaaa agtgggttct acgcaatgct tttgacgatg atcagaatcc 18780

ttatctgcca aaggtttgtt tgttttcttg tatcaggtcc aaaatcaaaa tctttgttta 18840

ttcatttgca taaacaggca gtagactccc aatacattgt gtacacttat gcacaaatgt 18900

atgagatgtg tattatatgt gtcacatata agggtatttc cacatggtgt ttattgatct 18960

agagaaagcg tacgacaggg ttcctaggga ggtcctatgg agatgcctag aggttaaagg 19020

ggtcccggtt gactgcatta gggtgattaa agacatgtat gatggagcta agactcgaat 19080

taggacagta ggaggcaact ccgaccattt tccggttgtt acggggttgc atcaagggtc 19140

tgcgttcaac cctttcctat ttgccttggt gatggatgct ataaccgcat catattcaag 19200

gggaggtgcc atggtgcatg ttatttgctg atgacatagt cctaattgac gagacacgac 19260

gcggcgtcaa cgagaggcta gaggtttgga gacatgccct tgagtctaaa ggtttcaggc 19320

tgagcaggac gaagacggaa tatctcgagt gcaannnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 19380

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 19440

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnatcgtata tgggtagggt ggatgaagtg gaggttagca 19500

acgggagtct tgtgtgacaa gaaagtgtca ccgttactaa ntctcgagtg caactttggg 19560

gccgagccga tggaagcatg agtggaagtg aggctcgact cacaagtcat ccctaagagg 19620

ggtagtttca agtaccttgg gtcagttatt caggggaccg gggagatcga cgaggatgtc 19680

acacatcgta taggggtggg gtggatgaag tggnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 19740

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnatag gggtagggtg 19800

gatgaagtgg aggttagcaa cgggagtctt gtgtgacaag aaagtgtcac cgttactaaa 19860

aggtaagttt tacagagcag tggttaggcc tgctatgttg catgggaccg agtgttggcc 19920

ggttaaaaat tcacacatct agaagatgaa agtagcagag atgaggatgc tgaggtggat 19980

gtgcgggcat acaaggatgg acaagattag gaatgaagtt attcgagaga aggtnttgag 20040

ccgagggtct cctggaaaca gcctctctgc ccctcggggt aggggtaagg tctgcgtaca 20100

tactaccctc cccagacccc attggtggga ttatactggg atgttgttgt tgttgttgtt 20160

gttgttgtac atataagggt attatatgta cacactcctc ccacctttca cttatatatt 20220

cacgtaaaac acatgcatgt gtaaaaccta tatatgtgtg tgtgatatat ataataaaat 20280

gatgtttgaa aagacattat gatcaagtag ttgatcttca tctgctttcc gtttttagca 20340

tatcttgtat aggcagaagg aacagttcag tgatggagtt ggctacagtt ggattgatgg 20400

tttgaaggat cacgcaagca gactggtgag ctttttagtt gttttctctt ccctcctctt 20460

ccattcttta tcccttcctt tgtggttttg ttgaacacat ctcgtatatt tggtccaggt 20520

ttctgattct atgttagcga atgcaagttt cgtttacccg cataacacac ccacgacaaa 20580

ggaaggatac tactatagaa ctatttttga gcgatatttc cccaaggtgg gtcttagata 20640

gtcttctttt ccttgttatt catgttcaat ttttgatatt ttgtcccaaa caatgttttc 20700

ttttttcttcc ttctgttaac aaggtcgctt ctatcttcat atttgttgat aaaggtaatc 20760

acattgataa ctattatttg gagcagaatg ctgcgaggga aacagttcca ggtggtccaa 20820

gtgtggcatg cagcactgca aaagcagtag aatgggacgc agcttggtcc aagaatctag 20880

atccatctgg acgagctgca ctcggtgttc atgcagctgc ttatgaggat gcatcagagg 20940

ttaaaaccac agtcgcaaca gatacccctc agaaacttga agttgataaa gctgcagtag 21000

ctgtttga 21008

<210> 10

<211> 581

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 10

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Phe Gly Cys Ile Asp Asn Ser Gln Ala

1 5 10 15

Lys Arg Ser Arg Ile Ile Glu Leu Ser Arg Arg Leu Arg His Arg Gly

20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Leu His Ser His Asp Asp Cys Tyr Leu Ala His
35 40 45

Gln Arg Leu Ala Ile Val Asp Pro Thr Ser Gly Asp Gln Pro Leu Tyr
50 55 60

Asn Glu Asp Lys Thr Ile Val Val Ala Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

His Arg Asp Leu Arg Glu Lys Leu Lys Ser His Gln Phe Arg Thr Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Glu Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Asp Tyr Gly Glu Asp
100 105 110

Phe Val His Met Leu Asp Gly Met Phe Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr
115 120 125

Arg Asp Lys Ser Phe Ile Ala Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Pro
130 135 140

Leu Tyr Met Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val Trp Phe Ser Ser Glu
145 150 155 160

Met Lys Ala Leu Ser Asp Asp Cys Glu Arg Phe Val Ser Phe Leu Pro
165 170 175

Gly His Ile Tyr Ser Ser Lys Asn Gly Gly Leu Arg Arg Trp Tyr Asn
180 185 190

Pro Pro Trp Tyr Ser Glu Thr Ile Pro Ser Thr Pro Tyr Asp His Leu
195 200 205

Val Leu Arg Lys Ala Phe Glu Lys Ala Val Val Lys Arg Leu Met Thr
210 215 220

Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser Leu
225 230 235 240

Val Ala Ala Val Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Asp Thr Glu Ala Ala Arg
245 250 255

Gln Trp Gly Ser Gln Leu His Thr Phe Cys Val Gly Leu Lys Gly Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Lys Ala Ala Arg Glu Val Ala Asp Tyr Leu Gly Thr Arg
275 280 285

His His Glu Phe His Phe Thr Val Gln Glu Gly Ile Asp Ala Leu Asp
290 295 300

Glu Val Ile Tyr His Val Glu Thr Tyr Asp Val Thr Thr Ile Arg Ala
305 310 315 320

Ser Thr Pro Met Phe Leu Met Ser Arg Lys Ile Lys Ser Leu Gly Val
325 330 335

Lys Met Val Leu Ser Gly Glu Gly Ser Asp Glu Ile Phe Gly Gly Tyr
340 345 350

Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys Glu Glu Phe His Gln Glu Thr
355 360 365

Cys Arg Lys Ile Lys Ala Leu His Leu Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn
370 375 380

Lys Ser Thr Ser Ala Trp Gly Val Glu Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp
385 390 395 400

Lys Glu Phe Val Asn Val Ala Met Asn Met Asp Pro Glu Ser Lys Met
405 410 415

Ile Arg Pro Asp Leu Gly Arg Ile Glu Lys Trp Val Leu Arg Asn Ala
420 425 430

Phe Asp Asp Asp Gln Asn Pro Tyr Leu Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg
435 440 445

Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly
450 455 460

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

Ala Ser Phe Val Tyr Pro His Asn Thr Pro Thr Thr Lys Glu Gly Tyr
485 490 495

Tyr Tyr Arg Thr Ile Phe Glu Arg Tyr Phe Pro Lys Asn Ala Ala Arg
500 505 510

Glu Thr Val Pro Gly Gly Pro Ser Val Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala
515 520 525

Val Glu Trp Asp Ala Ala Trp Ser Lys Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg
530 535 540

Ala Ala Leu Gly Val His Ala Ala Ala Tyr Glu Asp Ala Ser Glu Val
545 550 555 560

Lys Thr Thr Val Ala Thr Asp Thr Pro Gln Lys Leu Glu Val Asp Lys
565 570 575

Ala Ala Val Ala Val
580

<210> 11

<211> 17971

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> misc_dấu hiệu

<222> (1389)..(1389)

<223> n là a, c, g, hoặc t

<400> 11

atgtgtggaa tactagcagt tttcggttgc attgataatt ctcaggccaa gcgttcccga 60

atcatcgaac tttctagaag gtagaatttt tttaaaaaaa aaattgcatt ccaatttttc 120

tacagcattc ttattctttg gggtgacaat ggtatgcatg tgttttggat ttgctattcg 180

tggacttgtt cgctttctcg tggtcttcga tttgtttttg ttaatttata atcagtgttt 240

ttatatggat ttctttttg aatctctcaa atatatgaca tttgatttcc acgagaaaat 300

ttggcatttt tatggttctt atgatatgcg gttaaccctt cgccttgcat cgcttcagcg 360

ctttaaaaga cgaaatgatg gctattagta atactgctag agtggttatt gaattacatt 420

aaataacaga ttgctagtag atcaaattca gaatgacagt gaaatatctc tggaaacttg 480

aatccccgtt caattcgctg gtaaaacctg gcaaaaaaat agctttatct caaaggagag 540

tatgtcactg tgaaattggt ggtatgtgtt gtttaagctt taaggcatga tatgctgctc 600

ttaggtgatg tcaggatgat aataccatcc ttttcacact agactcagct ttgaagcact 660

ttcatctcag ttaatcggtg gaggaaaatc tagtttgctt tgggcataat ataccaaatg 720

tcttcctttt gttttctagt gttgtttctc aagaattgaa aaaccaacct acaatatagt 780

gatataatta actagttagc tcttcctgtt tttctgaaaa tttccaataa ttgagaagcg 840

tttacaggtc aattagtaaa gggagaacgg aacatttttt tcctctaaag aacttctctt 900

tttccataca gaatgacttt ctatacaagg cctaagtctg ctttagtgtc tgcgattaag 960

catcttctgg gaaacttcac acttgaaaga agtagaacta ggaggggggca ggtctagcaa 1020

gataattgct tcagtcattt ctcataaaaa aacattgttt cattcattat gtgcattcat 1080

atagagttgg ttaagctgct aagctgagct aatagtatga tagctatgaa tctcgacaaa 1140

gtaggttgct tcttagggct ttattctttg gctccgtaaa gaatttcttt tggaagggct 1200

tcagagtggg taggactgtt ctgatgataa gctgtaacac caacgaaaca agcctttgta 1260

gctgtggaag tccgaggggg tggtggtggt ggtggtggtg tgagagttag agtggtggag 1320

gagaggggag gagtgaagag aagtttatat tttaaagaat agggccttga gaacttttag 1380

tagtgagcng gggggggggg ggggcagagg ggaggagtga agagaagtat atattttaaa 1440

gaatagggcc ttgagaactt atagtagtaa gcatgcatta ttattattgt tgttattatt 1500

attattatta ttatttttat tattatgtaa gatgtaatta cttagctaat gaggtttttc 1560

caactatttc caaattgtga aatgtgttga aagcataatt aagtatataa aagcgtgttc 1620

tttctaatat ctttagcttt aagaggagat aatcacaaaa tttatcttga taatatagca 1680

gacaattttt cctagttcaa atctcacgtc acccttcata aaaaatttcc acgtgcttgg 1740

cttgcatgtt aggggacgtc ttgacataat taaacaaata taattgtccc tctctaacag 1800

cttaagcttt tagatgaggc ggtcaacaat tcaacaattt gcatttgttt gataagaagt 1860

tatattaaaa gaacacttaa aaggtgtcag tatgtgcaca aactcaaggt gtagactaac 1920

tagaagtcaa ttcaaatttt ctgcttgttc tctctgtttt acttcttttg cactatagaa 1980

attgcatttc cagcattccc gaaagctgct tcctttgcat atagacatca catttccagc 2040

gtgtctgata agcgttcttg cttattcctg tccctctact tggttgattt tcctctcact 2100

tagttcactg tcttcttgca cgcattatca aattgtgttc tcaattctct tgccttcttt 2160

tcatctgacc ccacaaaata cctcccaaaa agcctttagt ttctgctttt ccgagtctga 2220

aattatctgc ttattactgc ctttcaagta ttctgatacg ttgaccattg ttttccccag 2280

tagtaatgca ttgttctctg tccaatctct attttttttt ttgtgaacca ctattctttg 2340

ttgcttctgt ttcgtcatcc tcagttcccc atcttctcaa tttgattttc ctcatttaaa 2400

aagcgtgtgc ccctttttctt gtgctaccct ctcaaaaatc agttgctgtc atctcgtttg 2460

atctgtcatg aacccagttg atgccacatg tttagttctt tacctctgga caacttttac 2520

ttcctgagaa ccacaatttc ctttccttaa gaaattctta gaaattggtt atgtaaactg 2580

taaagggaaa atttcccagc aatcaccatt tggcctctac gtggcttgct tttcaactta 2640

ccgacacgtg ttcatcccct tttaacaaat gctgaccatt atcttctgct tgttggggca 2700

tgcttcttac ccatggtgtt aaccctgatc tttcgtatca cattttttcaa ctcttaattc 2760

tcatcttata aagtgcatat ccttgcctct ttagttgatc ttgggttggg ctgttaatcc 2820

aaattccatg ggctttgctt tgaagtatga taagcattag ctttactaca gtagcatatt 2880

ctacgttgct acagacatga aattttcctg atttgtcttt gatgtgatgt ctggcaagtg 2940

tagattacgc cacagaggac ctgactggag tggattgcat agccatgatg actgttatct 3000

tgctcatcaa cggttggcaa tagtagaccc aacttctgga gatcagccac tttacaatga 3060

ggacaagacc attgttgtcg cggtagggaa atatttatta tatcatttct tagatagtta 3120

agtattttac cagtacatgg actttggaca atatttgtgc gttttgatct tctatagcac 3180

aaacttttct cgtaggataa atttcctcta ctttgagtga atcttaacag gaaaatcgga 3240

ataaacaatt tgtgatttcg aaatttttag ttcttacata tttgaaacat gtgcggtgaa 3300

gtaactaggc gcttgactag gtgaatacgg agaatttcct ctactgttat cgatattttc 3360

tcagttcatt tgaaagatct ctgggtcgtc tagcagtaca actatttagg caacttaatc 3420

aaatcccctt cccatgagtt tcactttctt gacttgtttt atattttgac attttgcaat 3480

gccgaaaata aattgttttt ccattttatg acctttaaaa tgttgaggtg aagggctagg 3540

cggtacttta atcgacttat cggcaacaat gtattagata cagagcacaa acttgtttgg 3600

gtgcctaaat tgatattttt gaaaagtcga tggagtaaat ggaaatatgg attagcaaaa 3660

atattgaaat agtagatcta aacaatggat gactgaattt agaggaggac cttttcttct 3720

ttccttgttg aagtggttat aagagaatta ttggaagaaa atgtaagctt tagggtagtg 3780

ttgcaccata acagtcatgc tttccctcaa ttattagtgt agctgatgaa tgcttttgga 3840

aaggtggctg atttttgct gcgtatttta tgtctttcat catctcaaaa tttgttgtgt 3900

tttaacagtg cttggaaggc ctagagtctt ctgaaaaaag taggctgaga aaacatgagt 3960

aagcaaattt cttcctgctg gcaattaatc tttgtatatg aggtgaagcc acataatcta 4020

acatggtatt agacatataa atattatttt tgacatagag cagacagaaa tcttgggtct 4080

agttgctatc tcccttccta ataagatgcc ctcattgcta tatcccaaaa cagattcacc 4140

ctagaacgaa taaatctctc cttgcagcca catatatatt aataagtagt gtaacactaa 4200

aacatttgtg cttctgcaaa gtctgttgaa gtgggcgatt aagtaataaa ttgtgtgagt 4260

ttgactgaag agaaagtaat aaattgtgtg agcttctcac attttcatga taatgtcaat 4320

tcatctgatt gaacttttg aaggacatct ccttttctaa aagtttttgt tcacttcctg 4380

aaaatggttg ctttcccaaa tgtattctcc tgtattttcc ttgtgcttta tgttgaccag 4440

gatgactctg gccttccctt tttcaaatgg tgacttcatt acctttttaac aaaagatcaa 4500

atagcctttg tatgcttgaa atcgaagcag aatttagggc tcaatttctc taggagatgt 4560

gtagcagtaa cataacacgt ggttaaagca acttttaagc actgccactg tcaaatttga 4620

tatgacgcta ttactattta gagtgtcaaa tagtatttct tttgactacc aatttttcaa 4680

tatctttttt atacctttttt tctttgactg tgacttatag tatattttat gtagtttcag 4740

aatatatatt ttagttttta aagaattgat gtctgaaagt acagccaatt agatggtttc 4800

acccttgtac ttcaaatctt ataagttgtt taggttaaag gaataatatg catgattaca 4860

ttgtttggat tgaaattcag aagatcaaat gtgcaggcaa aaagcttgcg gaagatataa 4920

ttctgtcatt ttgttgttta gattaacttc ccctgtcaaa tagctaaaac taattcatac 4980

tttctcagga tccttcttga ttggactact ctgatcttct tccatatatt gatatatcat 5040

attccttttg cttttaggtt aacggggaga tatataacca tagagaatta cgggaaaagc 5100

tgaagtccca ccagtttcga actggcagtg actgtgaagt tattgcacat cttgtaagta 5160

ctttcagaat atattcaaat aaatatacat gacttctcag tttctgtgcg aagaatgatt 5220

tcaaaatacc atgactcaaa tttctcatca aaagagaaaa aggtggattg tagtaagaga 5280

atgagatttt ttgtcataat ttctttctta tggtatttga actccacgat ctacctatcg 5340

cagtatgaag actttggaga agacttcgtt cacatgttgg atggaatgtt ctcctttgtg 5400

cttcttaaca cccgtgataa aagtttcatt gctgctcggg atgcaattgg cattacgccc 5460

ctttatatgg gatggggtct tgatggtatg taatttttcc atttcataat ttttggtata 5520

ttgccctttt aataaatagc ctgtgagtta tgtgaagttc ctttgttgtt tccttgtttt 5580

ttatttgcct gatgcatctt tgttgttttg cctactataa tgctggtttc atgctgttgt 5640

tacaaacaaa tgatgtataa tagtgaacag tacatgtttt cttgccgctg tagatcaaca 5700

atgtaccaag aacatctgtc ttaagctagt tcaacctaat cttcagttat ctatcattcc 5760

agcgaataac acatgtagag ttaaccggac attacctaag gccagctata caacattgtg 5820

aggtgtgact aaggaactct gaacactgtt tggagaaatg gaaagcaaca tatccgtgtt 5880

tgttttgaag tactataagg aggcagcaac cttgctggat ttatcacttg acagcaaatg 5940

tcaatggttg aggaacattt tttatggctg gaggagaaac agagaagaga aaaaataatt 6000

gattttaaaa aacagaggag aaaattttgt gaagtcgtat gttaatttca atggctggag 6060

gtgcaatatt tgacttggca actagcgtgt agaagtttct ggttggggtt gagcatggaa 6120

gacactgttg cttttacaac tgtcattaga gtcggaaaca tattgtattc ttgagggagc 6180

gttgcaatgg ataaaaaagt cctacctact acttgatatt tgggcattca gaactggttg 6240

tctaaagctg agaaggaaga aaaggattta aaatggtgag tattgtaggc tttcttttct 6300

gtccagggtg cctggactag ttccctgaat tgggatactg gtggaggatt tcctgaaatt 6360

gatcatggcc aaagagatat gtcaggggat aagaacattg aaggatcaaa ggaaggtgct 6420

gcgctaagtt ttgctagaaa tgaacagttc cactatggct tttgtcaaag atgggaattg 6480

aattggcccc aacttctggg catctccatc catcgtcagg tgaacaaaag taaggttaca 6540

atggtagaat ttttcattat ttcaaacaag taaggtgaag tcgtcagcaa tcattgcctg 6600

agaaggaacc aggaacaaaa tctagaagat gtctgctaaa gtgctaatag ataatctgcc 6660

aaatttagca cggtaaggct agtgcagatc tggttcaaat tttaaattgg tccaaaatgc 6720

tttaataaat gtcggacctc gttttggtcc cccaaaaggt tgctatataa agacttgaca 6780

aagaaacagg tgaaggagaa gcccaaacaa ttgaacaaac tacacctagc ctaaagaaag 6840

tggttgatag tttggtcgga ggaggaagag cgagcctgcg gagagagcct caaacataaa 6900

aaatgaccta gtcttgtaat gagtctggcc aaatcaagta agctctgact ttcaagagag 6960

atcaacagaa aacttcgtca gtctagataa atcaagaaaa ttatgataat gaaaaggagg 7020

ctggacattc tactgccgac caaccctggt tttggtgtca gtgagacaag tggaactaaa 7080

gaagaatatg gatcaaaaga gtttatccgg ttgacacctg ataaactcac tacatcagtt 7140

ttcagttcaa aaacatttca attcttgctg ataaagacag gcaaactgtc acctaccaat 7200

caaaggaggt tgtttcaatt gagttagagg tatcaaagga ggcggcagta tatatggagc 7260

aagttttgat gaagggagtt gcttctattg gagaccacca ggtactcaag tgcttcccgt 7320

agttcctagg cattttataa ttgatatgac agagaaatgt cttattgaca agaatagact 7380

aggactacag ggataatagt gttgggaagg tgaggacttc tttggttgct gtcaggaact 7440

tggaaacaaa gggagaaagg ggttggaatc aaaggttttg atttcatttt tgatttatga 7500

ggaaataatg ggtagtggat ggagtcgagg atgggaaaga ggtttaccaa ttgcaccatt 7560

gaatatgtaa ttagagacac tatcctctta tttgggaaca cgactagggt gagggaacgc 7620

tccgacaggg atgtggttta ttcgggtatg ttggcacgaa gcttttgtgt ctaggtttgg 7680

tgttggctta agtgcaacac cttaggaaga caaacaaact taggacagat ttgatagttg 7740

tcggaaattg cacagtgatg atatttttctt cttccaaacg ttgggaatga ttgcacatgt 7800

agtaactaga gttatttctc atttaagctt ttatatgtaa gaatcaaata aaataattga 7860

tgaaatgcat gaaagcaact gtcttacgcc tgaatgcttt taaaaggcat gctttacaaa 7920

gtttttggta catctatctg acatgacaca ctaacattca ctcttatatg tgtacatatt 7980

taactaagtc caagcctaac tatctaactg gagatatcaa agttcttagc tctttaaagc 8040

tttcttaact ttaggaagat cctgcagtgt tgtttttttta taaccgtggt atccaggcta 8100

gcttgcacac atctcgacta attccaccgg gtgcttgcta tctcccacca acacagatta 8160

cctggtaact catgggaaga aatcacctat tgttttgagt ctgctggcat ttgaagtttt 8220

ggactactaa cctcatggtt ctcatcccac ttcattgacc acttggccac atccttgggt 8280

gcctgcactg tagctgtaac gaagatagtt tttttttccg ggatactctt atattgtgat 8340

aatttttttg tattcgctgt taatggatga ggttatgtga ctctccggtg gtgagagtgt 8400

taatgaacat caagctcata tgtcatttca ttttctgatt gatcttgctc ttcactcttt 8460

acgagtttaa tgtgttagtc cttcccagtt ttttttaaga gcgagaagcg caaaaaagcg 8520

acaagggctc gcctcgcttc aaaagcgaag cgcaaagcga agcgcacact ttattaaagt 8580

gaagcgcaat tcttaaaaaa cataatgtaa accttgcaaa gacacaatat aaaattataa 8640

ataatcaaaa agttcaaatt gtcaaaatca aagctactaa attactagaa tcaacctctt 8700

attcttctac tcttcttgtt cttcttcaag attgtcaaaa tcttgaattc ctctattatc 8760

ttcatattgc tcgtcatctt cctcctcccc ctcctcttcc tcttcatgat cactttcatc 8820

ttcatcaatt agggataggg atcgacttgt agtagccaca ctttttccct tcctaatcga 8880

gcttgaactt gaagtattcc cccttaaacc ataaggattc tccccaactc cactagcaac 8940

cgcaacatca ccccaagtga aattagaatc gccttcaaat acttcttcat cttcacaatt 9000

ttcggggact ccggttagcc actcattagc ctcatcaata ttgtccaaaa gaattggatc 9060

aattagattg cggtggttgt agcgacgcct caatgctcta ttgtatttta tgaacactag 9120

attatggagg cgcttcaagg ttagtcgatt cctcttcttt gtatgaatct gcaaacaaga 9180

tgtgtcaact aattagtagg agttgggaca attgagatat aatttacttt atctcaaaac 9240

acgaaataat tctttttatt tctcacgtgt tcaaaaacgc tccagttcct ttcacatccg 9300

gatgagctac aagttaaact tagaactctg atggcgaaag tctgtaaatt cggagtctct 9360

acaccatatt ggtcccacca ctcaactata gaagtgaaaa aaaaaaattc aagagttaat 9420

aagtataaaa aatacattaa agttagagct ataaaatata gaagcacttg gtcacctggc 9480

gatttcgtct ttctttgttt aatagcaagt cggagcttaa aaagtccctc agctgccttg 9540

taaatagcaa gctgatctac tatcttttct tgcatgtctt catctggggt caacttgata 9600

acaacctcat ggaatcctgt ccacacttct ctagccaatg aattattctc atgctgatca 9660

taaaagagtg acgggttcag aataagtcca gctgcatgca aaggtctatg aagttgctca 9720

ctccatcttg catcaatgat ctgaaagacc tttgcatatt tctgctcatc agtgaatgat 9780

gcttgaatag cctccttggc cctatccata gcttcataga ggtagcccat tggtggtttt 9840

tgctccccat ccaccaaacg gagtacttta accaaagggc caccaatttt aagagcatga 9900

aggacattat tccaaaaaga ataagaaaga ataatgcgtg caacatcttt ccctgcactt 9960

tcctttgcaa atttactctt gctccattcc tctgaagtga acaactttct caaattggat 10020

ttttgcaagt ggatactatg taaagtcaag aaagcagtgg cgaaccttgt cttgcccggt 10080

ttcaccaaat ttttttgtcc ggtgaatctt ctcatcatat tcaataacaa gggccgctga 10140

gaaatataag aatgtaccct aacgccctgg ccaaaaactg tagagaaggg tttttccttg 10200

aaaatgtccc cgaagattaa gttgatacaa tgagccgcac atggagtcca atagacattc 10260

ttgtacgctc cttccaccat gccacccgct ttcacatttt cactcgcatt atcagtgacc 10320

acttgaacaa ctttgcttgg gccaatcttt tcaatggtgt tctgaaacaa ggtgaacatt 10380

ttgatgtggt cagtggatga gtcgctagca tcaatggact caagaaacaa acttcccttg 10440

ggagaattca ccaacacgtt aataatcatt ttcccagttc ttgccgtcca cttatccatc 10500

ataatggagc agccatactt gttccacgca actttatgtt cctccacaat tttattagtc 10560

tcctccactt ccttatttag ataaggacct ctgatttcat gataagtggg aggcttcatt 10620

ccaggtccgt attgaccaac ggcctcaata aagtctccaa aagtgtcagt atagttgaca 10680

caattgaagg ggagcccagc atcatagacc catcgtgcaa aagctctaac tgcacgatcc 10740

ctcaaaatgt ccttagcaat tttttgtaca tcttttccac cgctctttcc ttccggcttc 10800

tttgggaaat agcaatctat aggaccttta gtcctactcg tacccgtcga tccatggctt 10860

gaagagattg catctcttcc ccgttttgtt ggaagtgaca attcttcaat atcatcatca 10920

ccatcatcat caagattggt caccaatggt tgatgactca tttgattttt ttgctccttc 10980

ttcttctcaa caaaattctt tatttcatcc ctcacctccg gtggacattt cggacaactt 11040

gtgacgtttc tatcgccacc aataagatgg aatttaaagc gataaattcc acccgttgta 11100

atcttgttac aaaacttgca tacaatattt gtattcttct cattaactct atcgccatat 11160

cgccaagccg ggtctttatc tttcgatctt tgagacattt tgaaatccct attaagatat 11220

aagaaaatac ataatcaaat aaactgaaaa tacatataat atatataata attaatttta 11280

taaaccgaaa tacacattaa aaaaatcaaa taaactaaaa tataacatat ataatttttct 11340

aaattgaaat acatataaaa ttaatcaaat aaactgaaaa cataacatat atataataat 11400

taattttata tactgaaaaa tgcattaaga aaatcaaata aactgaaaaa tataacatat 11460

ataaataata attaatttta tatactgaaa taaaaatcaa ataaactaaa atataacata 11520

tatatataat aattaatttt ctaaaatgaa atacatataa aattaatcaa ataaactgaa 11580

aatataacat atataaataa taattaatat tatatactga aatatacatt aaaaaatcaa 11640

ataaactgaa aaatataaca tatataaata ataattaatt ttatatgctg aaatatacat 11700

taaaaaaatc aaataaactg aaaaatataa catatataaa taataattaa ttttataaac 11760

taaaatacat attaaaagta ataaataaga agaataaagg ggggaaaaaa acaaaatggg 11820

ttagagataa aaggaagaag aagacgctga agtctgaaca gtgcaaactg gactgtcaga 11880

gtctcagaga taaacgaaga agaagaagga agaaagaagg aaaaagaaag aaaaaaaagc 11940

agaatctgac gggaccaaga agaagaaaga aagaagaaag aaaaaaaaga gaagaagaaa 12000

attacctgga ctggtcagca atgtcaatga agttgaaccc taggctttgg tcgacctcga 12060

tcgaagaaga gagaagaaga aatggccatt ttttgtcaat ttagggtctg ttttgtataa 12120

tagaaaaaca gacccaaagt ttttttttaaa aaaaaaaggg cctgcgcttt tttaacaaaa 12180

gcgatcgctt cgtcgcttcc tccgttgaag cgtgcgcttc cctcggtcga gtcgcctcag 12240

gcagctagaa gcgacactga gtcgcgtcgc gtcgcttcgc gctttaagcg cgaagcgatc 12300

gcttttctaa acactggtcc ttccaagttc tgtccatctt tctggtgtgc ttaacccatg 12360

tatattggac cacactttgt attcatgctg attgcaacaa agcctgactg atcctgaact 12420

cctccttttt gccttgggta gaattatttt tgtgttttta gtgttacata tttcaattta 12480

aaggaaaaag ggagaagctt aaggtagaat cctgctcctt gacctttgga tccttacaca 12540

ttgaagtgga cagacatgtt tgctttgctt tgctttgatg agttgtttta gtagtcagtc 12600

taagcaactg ctgatgtatt ctgctttatt gtaagtgtct ataatttta tctttccaca 12660

atttgctttc agctctttct gcatataaga gaaaataaca gaagcttcta ttcgatcatg 12720

taatattgac tgcacaagtg catatttaaa caactttggc tatgcgtatg caagcaataa 12780

taaatattac tttttatgca gggtctgtat ggttttcttc agagatgaaa gccttaagtg 12840

atgactgtga acgatttgtt agtttccttc ccggtcatat ttattcaagc aaaaatggta 12900

tgcccatacg aagctcattt ctgagcttgc gcttcattta tgatcagcgt acttttccta 12960

tttatttcag atttacttta ggaccctgtt ggaaacagtc ttgaaccctt attgatggtg 13020

taattattat ctcttgatca accaaaggag taattacatg taattattac aaatttgcaa 13080

caaaatcttt taggataatc agtggagctt catgaatctt ttaggatagt tgggatgcta 13140

gagtgatgta cttttgataa tgtcggttaa cataaatcct ctgactttgt actgatgtac 13200

tggctgagca gattttatat tactttctaa tccctctaca aataaaaaaa ttgtgagact 13260

gcaatataac accatttttt taatgcattt acaatgttta aacttgattt agcaacgtag 13320

aacatgtcga ccttaaacag aggttctatt tgtcctagat aaaggaagat cagcataatg 13380

aaacattaca ggagaggagc tctattgagt ttttgttaat ctagagggag cccgtaaata 13440

gtacaccaat tcatctctta tatgacttct ttttcatttt ggaacgtttt aaaagtttga 13500

ctacattttt tgatctccgt acactaaact ttttgatgta ttaaactaac tatttccact 13560

actttaatat tttcttcctt aaacaactcc tgttagcatc ttaaactctg tgtgttcaat 13620

accctcatat aaaattatac gagtattttt tttatatttg cttatgtcct tggagtttgg 13680

gatggggaag ctcatcattt gaggcgaaag gtaaattctt ttgaatggac aaaaagtgaa 13740

cctcggtctt tggcatggag ggactattta agtcgccatc attaccaaag tcatcctttc 13800

aagtgtttgc tttcaagaac tattcatgct atgtctcaag tatattatgt gtgcaggagg 13860

actcagaaga tggtacaacc caccatggta ctcagaaacc attccttcta ctccatatga 13920

tcaccttgtc ttacggaaag cttttgagaa ggtcattcta ttttggaagt cgcttgtttc 13980

tgagttgtat ataatattta ggtgccactt tgttatattt taaacttcat caaaagcctt 14040

tggattcttt gaggacacat atccccttga ctgactggga gctgaatttc cttgatgtat 14100

agtgcttatt ttgattgtcc tctcctttgt aatactcttg cctataaata aaccttcctt 14160

atcaaaagaa aatgataaaa tgttaaaaat actttgtgat agatgttgac tatagacttt 14220

aaatgatatt ttatctcaat ctttatcaat tctttttac cttcacatgc aaattatact 14280

acagtatgtg aaatatgcaa tagtttgtcc tgcaattttc atctttcatg tacctctctc 14340

tactatccgt gtattactac tgatttgatg cattaaatgc taattttatt cccaaccttt 14400

actttatgca ggctgtagtc aagcgactta tgacggatgt accatttggt gtgcttctct 14460

caggcggact agattcttca cttgttgctg cagtggccaa ccgctatttg gctgatactg 14520

aagctgcgcg acaatgggga tcacagttgc ataccttttg cgtaggcttg aaggtggtga 14580

tgctcctttt tgtaaacttg ctctgatttg ggaattgcta gctgtatcat cccaatttac 14640

atggaagttc tagaccatta ttgctgtttc ttttccatat atagggattt tctgaaaata 14700

gtaaaaagga aatggaattt ctctttatta aagataccga atgccttttt gggaaatgat 14760

cttacagttc tgaatcgaaa atttcctttt gacattgtga ttaattctga tatgaatttg 14820

gtccatcctg gctttccttc tcttgattgt agattttcct tctcttgtta caattatatg 14880

cctgtctttt tgtcttactc tctgagacag gcaatgtaac tccagttgca aggtttggta 14940

atattgactt gtttatttct gttatcacat cctcctgaaa aagtgctact agcttgtatt 15000

catgcgggaa tttgaaattt tcaagtgtat agctttacaa aatgatcaga actgatcaca 15060

gtcattgctc taaataaaat tttctaaaaa gcaggtattg ttgtgatata atgtgacact 15120

taaataaatt taaacctaca tcctttcgaa atctgtaata gctccactaa tatttcttgt 15180

gctaaactat tccaacacct cttatcgatg ccaattttga cagaccttag tgcacttaaa 15240

agtgtttagt gttctttatg cagtaggtat gttattgtcc aaaatgacag aaataaagtt 15300

agagatttgt tgaaagccac ttggtgtgat tgagcagttc ggagatgagt gatttatcca 15360

ttttatatac ttgtagtgtt ttgttttctt ttgcttttgt cattgtaatt aaggttgtct 15420

tttgtttgac attagggttc tcctgatctg aaagctgcca gagaggtggc agactacctt 15480

ggaacccgtc accatgagtt tcactttaca gtgcaggtaa ctttccacaa agacatccta 15540

ccatgtgacc aggaggtcac gggtttgagc tgtggaaaca acctttttgca gaaatgcagc 15600

gtaaggttgc gtacaataga cccttgtggt ccggcccttc cccgaccccg cacatagcgg 15660

gagcttagtg caccgggctg cccatcctaa gctgattttc cttataggag tataaccgct 15720

taagtcaaat tggctatcta cttctttcta ttgctacatc aggaaggaat tgatgcacta 15780

gatgaagtca tttatcatgt tgaaacatat gatgtgacca ctatcagagc cagtacacca 15840

atgtttctca tgtctcggaa gataaagtct ttgggtgtga aaatggttct atctggtgaa 15900

ggttctgatg aaatttttgg cggttattta tatttccaca agggacccaa caaagaggag 15960

tttcaccaag aaacttgtag aaaggtggat ctcattgtca tttcttcagt cattcaggat 16020

tattggaagt aactgtattt ttactagaat acttctttga actatttcta gctctgatgg 16080

acgctttgat gttaatccag attaaagcac ttcatcttta tgattgcttg agggccaaca 16140

aatctacttc agcttggggt gttgaagctc gtgtaccttt cttggataaa gaatttatca 16200

atgttgcaat gaacattgat ccagagtgga aaatggtaac ctacagtgct tccgtctcat 16260

ttctccaccc cccacccccc caaaaaaaag aacagaaaag aattgaaaag agagattctt 16320

ttcttccttc aaggaagaag ggggtaacaa aagaatagct gcaagttatg cagaaaaaat 16380

agtcttccat gtcatgggag accagggttc aaatctgatt gttaaaaaaa acactaggtg 16440

aactcttcta atctgtttaa gccttggtgg acatagttaa ctagtatatg agctagttag 16500

agctgactcg aaaccaccat tattcaaaaa attaagaaag tcttcaatgt tgttccaccg 16560

tgaattcatg atgtgtcgac tttcatgtgt ttatctctgg atagatgaag agttttttg 16620

gatcttgatt aattctgttt ggccccttg aggttctgca cgctatttct agactcaaac 16680

ttgctgcgac ctatgttagg tctagagaat atctgcctaa taaaacaatg gaagttacat 16740

tcaagtattt tacctccata ttacaagtca gtgttagtta aatgggtctg atatatggga 16800

tagaaaatgg cttcataccc ataacctcgt taaaatgttg ctgatgtgct gatctcatct 16860

gtacatctag tataatccta attacaaatt aatgcatctc tttgcggtga ctatagtatg 16920

ctgaagaacc tgtcttgaaa cattgcagat cagacctgat ctcggaagaa tagaaaagtg 16980

ggttctacgc aatgcttttg acgatgatca gaatccttat ctgccaaagg tttgtttgtt 17040

ttcttgtatc aggtccaata atcataatct ttgtttattc atttgcataa aaggcagtag 17100

actcccaata cattgtgtac gcttatgcac aaatgtatga gatgtgtatt atatgtgtca 17160

catataaggg tattatatgt acacactcct cccaccttcc acatatatta tgtgtgtgtg 17220

tgtgtgtgta taatgaaatg atgtttgaaa agacattatg atcaagtagt tgatcctcat 17280

ctgctttctg tttttagcat atcttgtata ggcagaagga acagttcagt gatggagttg 17340

gctacagttg gattgatggc ttgaaggatc acgcaagcag tctggtgagc tctttagttg 17400

ttttctcttc cctcctcttc cattctttat cccttccttt tgtggttttg ttgaacacat 17460

ctcatatact tggtccaggt ttctgattct atgttagcga atgcaagttt tgtttacccg 17520

cataacacac ccacgacaaa ggaaggatac tattatagaa ctatttttga gcgatatttc 17580

cccaaggtgg gtcttacata gtcttctttt ccttgttatt catgttcagt ttatgatatt 17640

ttgtcccaaa caatgttttc ttttttcttcc ttttttctgtt aacaagatcg cttctatctt 17700

cgtatttgtt gataaagtta atcacattgt taactattat ttggagcaga atgctgcgag 17760

ggaaacagtt ccaggtggtc caagtgtggc atgcagcact gcaaaagcag tagaatggga 17820

cgcagcttgg tccaagaatc tagatccatc tggtcgagct gcactcggtg ttcatgcagc 17880

tgcttatgag gatgcatcag aggttaaaac cacagtcgcg acagatactg ctcagaaact 17940

tgacgttgat aaagctgcag tagctgtttg a 17971

<210> 12

<211> 581

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 12

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Phe Gly Cys Ile Asp Asn Ser Gln Ala

1 5 10 15

Lys Arg Ser Arg Ile Ile Glu Leu Ser Arg Arg Leu Arg His Arg Gly

20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Leu His Ser His Asp Asp Cys Tyr Leu Ala His

35 40 45

Gln Arg Leu Ala Ile Val Asp Pro Thr Ser Gly Asp Gln Pro Leu Tyr

50 55 60

Asn Glu Asp Lys Thr Ile Val Val Ala Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

His Arg Asp Leu Arg Glu Lys Leu Lys Ser His Gln Phe Arg Thr Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Glu Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Asp Tyr Gly Glu Asp
100 105 110

Phe Val His Met Leu Asp Gly Met Phe Ser Phe Val Leu Leu Asp Thr
115 120 125

Arg Asp Lys Ser Phe Ile Ala Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Pro
130 135 140

Leu Tyr Met Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val Trp Phe Ser Ser Glu
145 150 155 160

Met Lys Ala Leu Ser Asp Asp Cys Glu Arg Phe Val Ser Phe Leu Pro
165 170 175

Gly His Ile Tyr Ser Ser Lys Asn Gly Gly Leu Arg Arg Trp Tyr Asn
180 185 190

Pro Pro Trp Tyr Ser Glu Thr Ile Pro Ser Thr Pro Tyr Asp His Leu

195 200 205

Val Leu Arg Lys Ala Phe Glu Lys Ala Val Val Lys Arg Leu Met Thr
210 215 220

Asp Val Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Gly Gly Leu Asp Ser Ser Leu
225 230 235 240

Val Ala Ala Val Ala Asn Arg Tyr Leu Ala Asp Thr Glu Ala Ala Arg
245 250 255

Gln Trp Gly Ser Gln Leu His Thr Phe Cys Val Gly Leu Lys Gly Ser
260 265 270

Pro Asp Leu Lys Ala Ala Arg Glu Val Ala Asp Tyr Leu Gly Thr Arg
275 280 285

His His Glu Phe His Phe Thr Val Gln Glu Gly Ile Asp Ala Leu Asp
290 295 300

Glu Val Ile Tyr His Val Glu Thr Tyr Asp Val Thr Thr Ile Arg Ala
305 310 315 320

Ser Thr Pro Met Phe Leu Met Ser Arg Lys Ile Lys Ser Leu Gly Val
325 330 335

Lys Met Val Leu Ser Gly Glu Gly Ser Asp Glu Ile Phe Gly Gly Tyr

340 345 350

Leu Tyr Phe His Lys Ala Pro Asn Lys Glu Glu Phe His Gln Glu Thr
355 360 365

Cys Arg Lys Ile Lys Ala Leu His Leu Tyr Asp Cys Leu Arg Ala Asn
370 375 380

Lys Ser Thr Ser Ala Trp Gly Val Glu Ala Arg Val Pro Phe Leu Asp
385 390 395 400

Lys Glu Phe Val Asn Val Ala Met Asn Met Asp Pro Glu Ser Lys Met
405 410 415

Ile Arg Pro Asp Leu Gly Arg Ile Glu Lys Trp Val Leu Arg Asn Ala
420 425 430

Phe Asp Asp Asp Gln Asn Pro Tyr Leu Pro Lys His Ile Leu Tyr Arg
435 440 445

Gln Lys Glu Gln Phe Ser Asp Gly Val Gly Tyr Ser Trp Ile Asp Gly
450 455 460

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

Ala Ser Phe Val Tyr Pro His Asn Thr Pro Thr Thr Lys Glu Gly Tyr

485 490 495

Tyr Tyr Arg Thr Ile Phe Glu Arg Tyr Phe Pro Lys Asn Ala Ala Arg
500 505 510

Glu Thr Val Pro Gly Gly Pro Ser Val Ala Cys Ser Thr Ala Lys Ala
515 520 525

Val Glu Trp Asp Ala Ala Trp Ser Lys Asn Leu Asp Pro Ser Gly Arg
530 535 540

Ala Ala Leu Gly Val His Ala Ala Ala Tyr Glu Asp Ala Ser Glu Val
545 550 555 560

Lys Thr Thr Val Ala Thr Asp Thr Pro Gln Lys Leu Glu Val Asp Lys
565 570 575

Ala Ala Val Ala Val
580

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 13

tcacatatat tccctcataa cacac 25

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 14

aagaagcatc ccactctaca gctt 24

<210> 15

<211> 26

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 15

atatcttccc tcacaacact ccaact 26

<210> 16

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi

<400> 16

ctaccggaag gatcaaggtt gt 22

<210> 17

<211> 330

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 17

tcacatatat tccctcataa cacacccatt acaaaggaag catactacta taggatgatt 60

ttcgagcgct ttttcccaca gaattcagct gggctaaccg ttcctggagg agcaagtgtg 120

gcgtgtagca cagctaaagc tgtagagtgg gatgcttctt ggtcaaagaa ccttgatcct 180

tcaggcaggg ctgctattgg tgtacataac tcggcttatg agaatcatgt acctgctatg 240

gctaatggga atttgaccaa aaaaatcatt ggtcgtgtgc cttctatggt agaagttggt 300

gctgctcccg agctcacaat aaagagttag 330

<210> 18

<211> 364

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 18

gaccagattg gagtgggata tatcaacatg gtgattttta cttagcacat caacgtttag 60

caattatcga tcctacttct ggtgatcagc ctctgtttaa tcaagataag actattgttg 120

ttacagtcaa tggagaaatt tacaatcatg agaaacttcg taatcttatg cctaatcaca 180

agttcagaac cggaagtgat tgtgatgtta ttgcacatct ttatgaagaa tatggagaaa 240

attttgtgga catgttggat ggggtgttct cttttgtatt gttggatacg cgcgataaca 300

gctttcttgc tgctcgtgat gcgattggaa ttactcccct ctatattggt tggggacttg 360

atgg 364

<210> 19

<211> 1815

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 19

atgtgcggga tcttggctgt tttgggttgt tctgatgatt ctcaggccaa aagggttcgt 60

gttctcgagc tctctcgcag gtaggttgaa gcatcgtgga ccagattgga gtgggctgta 120

tcaacatggg gactgttact tggcacatca gcgtctagct attgttgatc ctgcttccgg 180

tgatcaacct ctgtttaacg aagataagac gattgttgtt acggtaggta aatggagaga 240

tctacaatca cgagcaactt cgtaagcaaa tgcctaatca taagttccgg actggcagtg 300

actgtgatgt cattgcacac ctagtagtat gaagaacatg gagaagattt tgtggacatg 360

ctggatggga tcttcgcttt tgtgttattg gatactcgag ataacagctt tcttgttgct 420

cgtgatgcca ttggaattac ttccctttat attggttggg gacttgatgg tagggtctgt 480

atgaatatca tctgagctta agggcttgaa tgatgactgc gaacattttg aagttttccc 540

accagggcac ttgtactcta gcaagaatgg cggctttagg aggtggtaca atcctccttg 600

gttctctgag gccattcctt ccactcgtta tgatccctta gttctcaggc gtgcctttga 660

aaatgtaggc tgttatcaaa aggttgatga ctgatgtccc ctttggtgtt ctcctctccg 720

ggggactcga ttcatccttg gttgcttcga ttactgctcg ctacttggct ggtacaaagg 780

ctgccaagca gtggggagca cagcttcatt ccttctgtgt tggccttgag gtagggctca 840

ccggatctca aggctgcaag agaagttgct gactacttgg gaaccgttca ccacgagttt 900

cacttcaccg ttcaggtagg atggaattga tgcaattgaa gatgttattt accatattga 960

gacatacgat gtaacgacaa tcagagcaag cactcctatg ttccttatgt cgcgtaagat 1020

taagtcacta ggagtgaaga tggtcatatc tggggaagga tctgatgaag tgtttggtgg 1080

ctacttgtac tttcacaagg ctcccaacaa ggaagagttc cacaaggaaa catgtcgcaa 1140

ggtagattaa agcgcttcac caatatgact gcttaagagc aaataagtca acatctgcat 1200

ggggtttaga agctagagtc cctttcctag ataaggagtt catcaatgtt gccatgagta 1260

ttgatccaga gtggaagttg agattaaacc agagcaaagg aggattgaaa agtgggctct 1320

aaggagggcc tttgatgatg aggagcatcc ttatctccca aaggtagcac atcctgtata 1380

ggcaaaaaga acaattcagt gatggcgtgg gcatagttgg atagatggac tcaaagcaca 1440

tgctgaacaa catgtaggtg accaatagga tgatgtttaa tgcttcacat atattccctc 1500

ataacacacc cattacaaag gaagcatact actataggat gattttcgag cgctttttcc 1560

cacaggtaga attcagctgg gctaaccgtt cctggaggag caagtgtggc gtgtagcaca 1620

gctaaagctg tagagtggga tgcttcttgg tcaaagaacc ttgatccttc aggcagggct 1680

gctattggtg tacataactc ggcttatgag aatcatgtac ctgctatggc taatgggaat 1740

ttgaccaaaa aaatcattgg tcgtgtgcct tctatggtag aagttggtgc tgctcccgag 1800

ctcacaataa agagt 1815

<210> 20

<211> 155

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 20

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Gln Ala
1 5 10 15

Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly
20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Leu Tyr Gln His Gly Asp Cys Tyr Leu Ala His
35 40 45

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

Asn Glu Asp Lys Thr Ile Val Val Thr Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

His Glu Gln Leu Arg Lys Gln Met Pro Asn His Lys Phe Arg Thr Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Asp Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Glu His Gly Glu Asp
100 105 110

Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Ile Phe Ala Phe Val Leu Leu Asp Thr
115 120 125

Arg Asp Asn Ser Phe Leu Val Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Ser
130 135 140

Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val
145 150 155

<210> 21

<211> 1818

<212> ADN

<213> Nicotiana tabacum

<400> 21

atgtgcggga tcttggctgt tttgggttgt tctgatgatt ctcaggccaa aagggttcgt 60

gttctcgagc tctctcgcag gtaggttgaa gcatcgtgga ccagattgga gtgggctgta 120

tcaacatggg gactgttact tggcacatca gcgtctagct attgttgatc ctgcttccgg 180

tgatcaacct ctgtttaacg aagataagac gattgttgtt acggtaggta aatggagaga 240

tctacaatca cgagcaactt cgcaagcaaa tgcctgatca taagttccgg actggaagtg 300

actgtgatgt cattgcacac ctagtagtat gaagaacatg gagaagattt tgtggacatg 360

ctggatggga tcttcgcttt tgtgttactg gatactcgag ataacagctt tcttgttgct 420

cgtgatgcca ttggaattac ttccctttat attggttggg gacttgatgg tagggtctgt 480

atgaatatca tctgagctta agggcttgaa tgatgactgc gaacattttg aagttttccc 540

accaggacac ttgtactcta gcaagaatgg cggctttagg aggtggtaca atcctctttg 600

gttctctgag gctattcctt ccactcctta tgatccctta gttctcaggc gcgcctttga 660

aaatgtaggc tgttatcaaa aggttgatga ctgatgtccc ttttggtgtt ctgctctccg 720

ggggactcga ttcatccttg gttgcttcga ttactgcccg ctacttggct ggcacaaagg 780

ctgccaagca gtggggagca cagcttcatt ccttctgtgt tggccttgag gtagggatca 840

ccggatctca aggctgcaag agaagttgct gactacttgg gaaccgttca ccacgagttt 900

cacttcaccg ttcaggtagg atggaattga tgcaattgaa gatgttattt accatattga 960

gacatacgat gtaacgacaa tcagagcaag cactcctatg ttccttatgt cgcgtaagat 1020

taagtcacta ggagtgaaga tggttatatc tggggaaggc tctgatgaag tgtttggtgg 1080

ctacttgtac tttcacaagg ctcccaacaa ggaagagttc cacaaggaaa catgtcgcaa 1140

ggtagattaa agcacttcac caatatgact gtttaagagc aaataagtca acatctgcat 1200

ggggcttaga agctagagtg cctttcctag ataaggagtt catcaatgtt gccatgagta 1260

ttgatccaga gtggaagttg gtagattaaa ccagagcaaa ggaggattga gaagtgggct 1320

ctaaggaggg cctttgatga tgaggagcat ccctatctcc caaaggtagc acatcctata 1380

caggcagaaa gaacaattca gtgatggcgt aggctatagt tggatagatg gactcaaagc 1440

acatgctgaa caacatgtag gtgaccaata ggatgatgct taatgcttca catatattcc 1500

ctcataacac accgattaca aaggaagcat actattatag gatgattttc gagcgctttt 1560

tcccacaggt agaattcagc tgggctaacc gttcctggag gagcgagtgt ggcgtgtagc 1620

acagctaaag ctgtagagtg ggatgcttct tggtcaaaga accttgatcc ttcaggaagg 1680

gctgctattg gtgtacataa ctcagcttat gagaatcatg aacctgctat ggctaatggg 1740

aatttggcca caaaaatcat tggccgtgcg ccgtctatgg tagaagttgg tgctgctcat 1800

gagctcacaa taaggagt 1818

<210> 22

<211> 155

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 22

Met Cys Gly Ile Leu Ala Val Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Gln Ala
1 5 10 15

Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly
20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Leu Tyr Gln His Gly Asp Cys Tyr Leu Ala His
35 40 45

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

Asn Glu Asp Lys Thr Ile Val Val Thr Val Asn Gly Glu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

His Glu Gln Leu Arg Lys Gln Met Pro Asp His Lys Phe Arg Thr Gly
85 90 95

Ser Asp Cys Asp Val Ile Ala His Leu Tyr Glu Glu His Gly Glu Asp
100 105 110

Phe Val Asp Met Leu Asp Gly Ile Phe Ala Phe Val Leu Leu Asp Thr

115 120 125

Arg Asp Asn Ser Phe Leu Val Ala Arg Asp Ala Ile Gly Ile Thr Ser

130 135 140

Leu Tyr Ile Gly Trp Gly Leu Asp Gly Ser Val

145 150 155

<210> 23

<211> 1818

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của thể mang đột biến kết thúc ASN5-S: ASN5-S_Q66*

<220>

<221> đột biến

<222> (199)..(201)

<400> 23

atgtgtggaa tcttggcttt gttgggttgt tcagatgatt ctcaggccaa aagggttcga 60

gttcttgagc tctctcgcag gcaggttgaa gcatcgtgga ccagattgga gtgggatata 120

tcaacatggt gatttttact tagcacatca acgtttagca attatcgatc ctgcttctgg 180

tgatcagcct ctgtttaatt aagataagac gattgttgtt acagtaggtc aatggagaga 240

tttacaatca tgagaaactt cgtaatctta tgcctaatca caagttcaga actggaagtg 300

attgtgatgt tattgcacat cttgtagtat gaagaatatg gagaaaattt tgtggacatg 360

ttggatgggg tgttctcttt tgtattgttg gatacgcgcg ataacagctt tcttgctgct 420

cgtgatgcaa ttggaattac tcccctatat attggttggg gacttgatgg taggctctgt 480

gtggatttca tctgagctaa aaggattaaa tggtgactgt gaacattttg aagttttccc 540

tcccggtcac ttgtactcga gcaagaatgg cgggtttagg agatggtaca atcctcaatg 600

gttctctgag gctattccat caaatcctta cgacccctta gttttgagac gtgccttcga 660

aaatgtaggc tgttatcaaa cgattgatga ccgatgtccc ctttggtgtt ctgctctccg 720

ggggacttga ttcgtctttg gttgcttctg tcactgctcg ctacttggct ggaacaaaag 780

ctgctaagca atggggagca cagcttcatt ccttctgtgt tggtctcgag gtagggctca 840

ccagatctca aggctgcaag agaagttgct gactatttgg gaaccgttca ccacgagttc 900

accttcacag ttcaggtagg atggaattga tgctattgaa gatgttattt accatatcga 960

gacatacgat gtaacaacga tcagagcaag cactcctatg ttccttatgt cgcgtaagat 1020

taaatcactg ggagttaaga tggtcatatc aggggaaggc tcagatgaac tgtttggcgg 1080

ctatttgtac ttccacaagg ctccgaacaa ggaagaattc catgtggaga catgtcacaa 1140

ggtagataaa agcgcttcac caatacgact gtttgagagc aaataaggca acatcagcat 1200

ggggcttaga agctagagta ccatttctgg ataaagagtt catcaacgtt gctatgagta 1260

tcgatcctga atggaagatg gtagattaaa cacgatcatg gtaggatcga gaagtgggtt 1320

cttaggaagg cttttgatga tgaggagcaa ccctatctcc caaaggtagc atattctgta 1380

ccggcagaaa gaacaattca gtgatggcgt aggctatagt tggatcgatg gactcaaagc 1440

acatgctgaa caacatgtag gtgactgata ggatgatgct taatgctgca catatcttcc 1500

ctcacaacac tccaactaca aaggaagcat actattacag gatgattttc gagaggttct 1560

tcccacaggt agaattcagc aaggctaact gttcctggag gaccgagtat agcttgcagc 1620

acagctaaag ctattgagtg ggatgcttcg tggtcgaaca accttgatcc ttccggtagg 1680

gctgcaatcg gtgtacataa ctcggcttat gacgatcatc tccccgatgt tggtaatggg 1740

aatttggaca caacgatcat cgataatgtg ccgaggatgg taggagtggg tgctgctgca 1800

gagctcacaa taaggagc 1818

<210> 24

<211> 65

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của Thể mang đột biến kết thúc ASN5-S: ASN5-S_Q66*

<400> 24

Met Cys Gly Ile Leu Ala Leu Leu Gly Cys Ser Asp Asp Ser Gln Ala
1 5 10 15

Lys Arg Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Arg Arg Leu Lys His Arg Gly
20 25 30

Pro Asp Trp Ser Gly Ile Tyr Gln His Gly Asp Phe Tyr Leu Ala His
35 40 45

Gln Arg Leu Ala Ile Ile Asp Pro Ala Ser Gly Asp Gln Pro Leu Phe
50 55 60

Asn
65

Fig.1

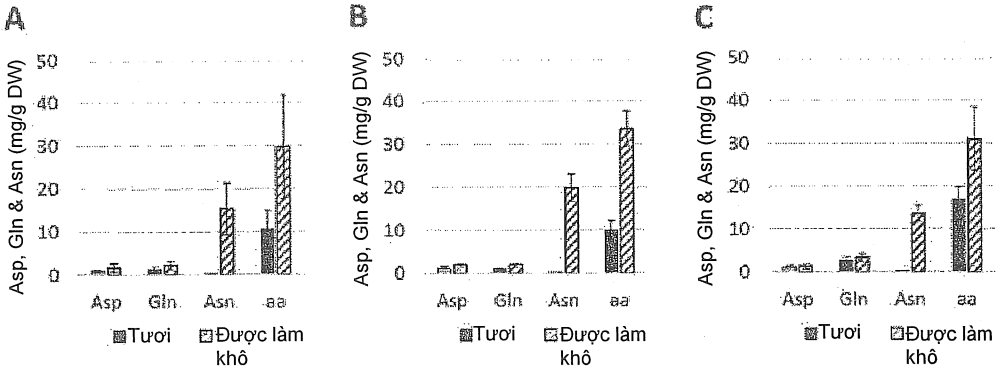

A
B
C
Asp, Gln & Asn (mg/g DW)
50
40
30
20
10
0
Asp
Gln
Asn
aa
Tươi
Được làm khô

Fig.2

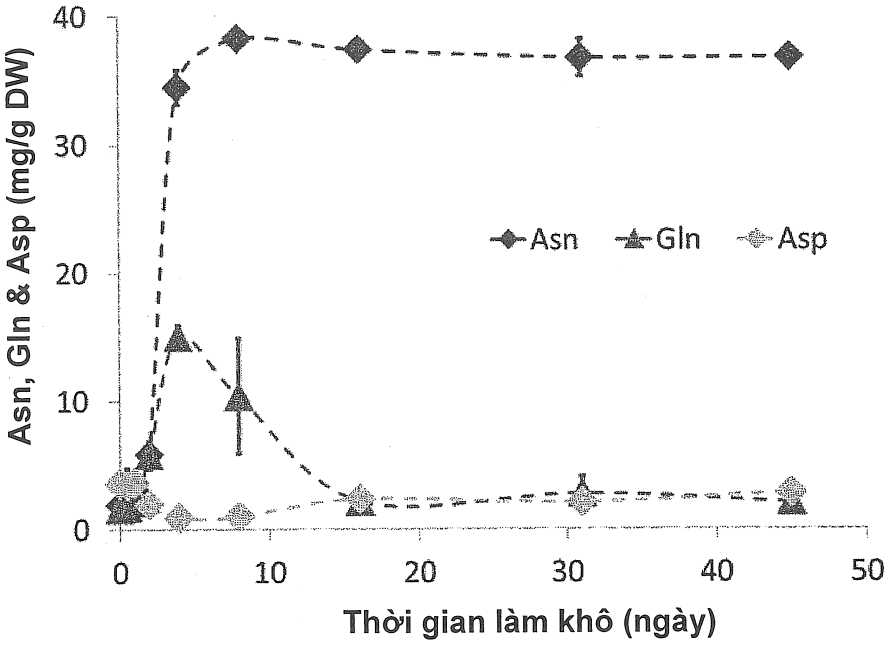

Asn, Gln & Asp (mg/g DW)
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
Thời gian làm khô (ngày)
Asn
Gln
Asp

Fig.3



Fig.4

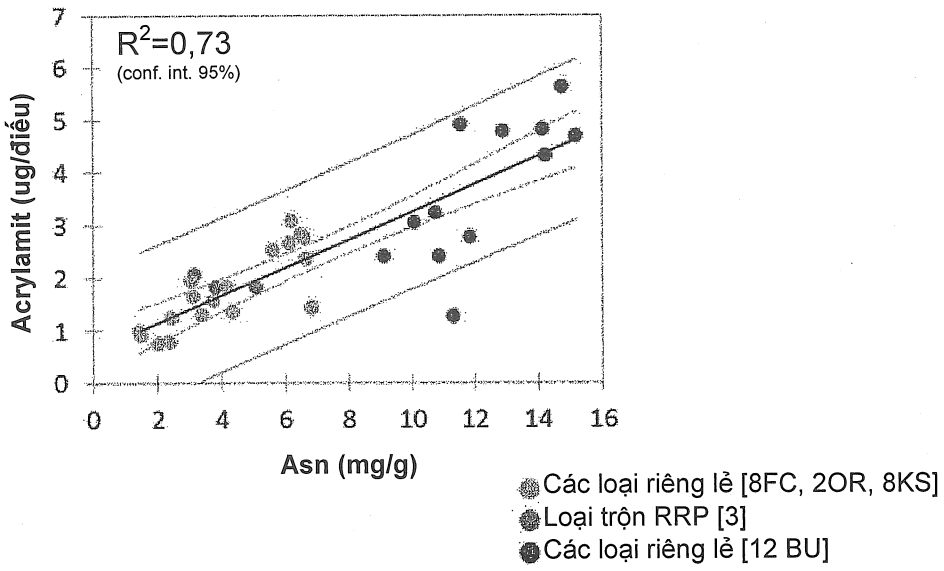

R2=0,73
(conf. int. 95%)
Acrylamit (ug/điếu)
Asn (mg/g)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Các loại riêng lẻ [8FC, 2OR, 8KS]
Loại trộn RRP [3]
Các loại riêng lẻ [12 BU]

Fig.5

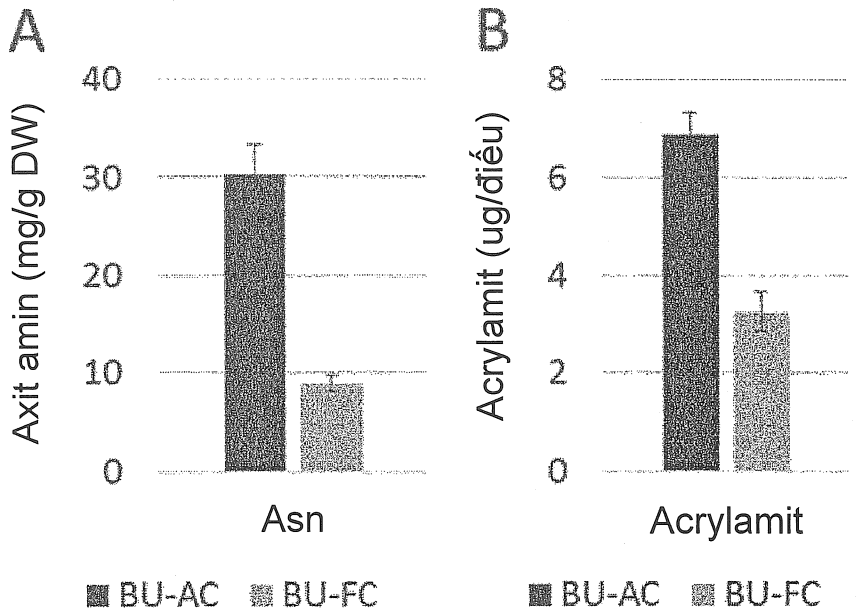

A
Axit amin (mg/g DW)
40
30
20
10
0
Asn
BU-AC
BU-FC
B
Acrylamit (ug/điếu)
8
6
4
2
0
Acrylamit
BU-AC
BU-FC

Fig.6

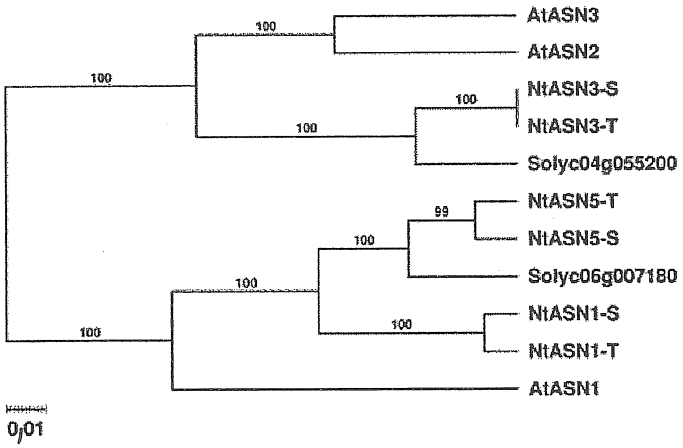

AtASN3
AtASN2
NtASN3-S
NtASN3-T
Solyc04g055200
NtASN5-T
NtASN5-S
Solyc06g007180
NtASN1-S
NtASN1-T
AtASN1
100
100
100
100
99
100
100
100
100
0,01

Fig.7

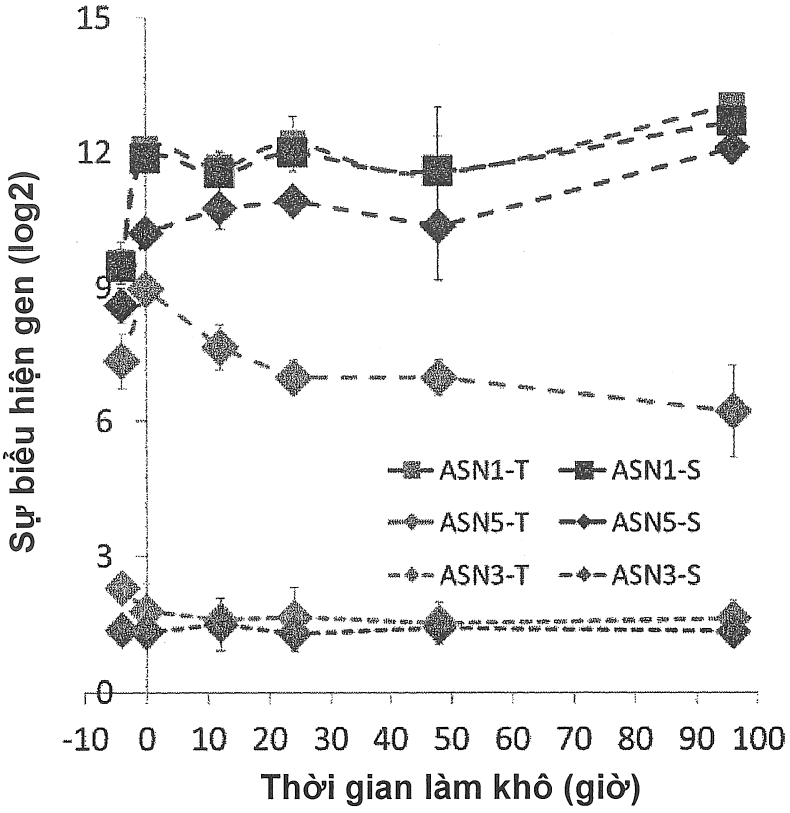

15
12
9
6
3
0
Sự biểu hiện gen (log2)
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Thời gian làm khô (giờ)
ASN1-T
ASN1-S
ASN5-T
ASN5-S
ASN3-T
ASN3-S

Fig.8

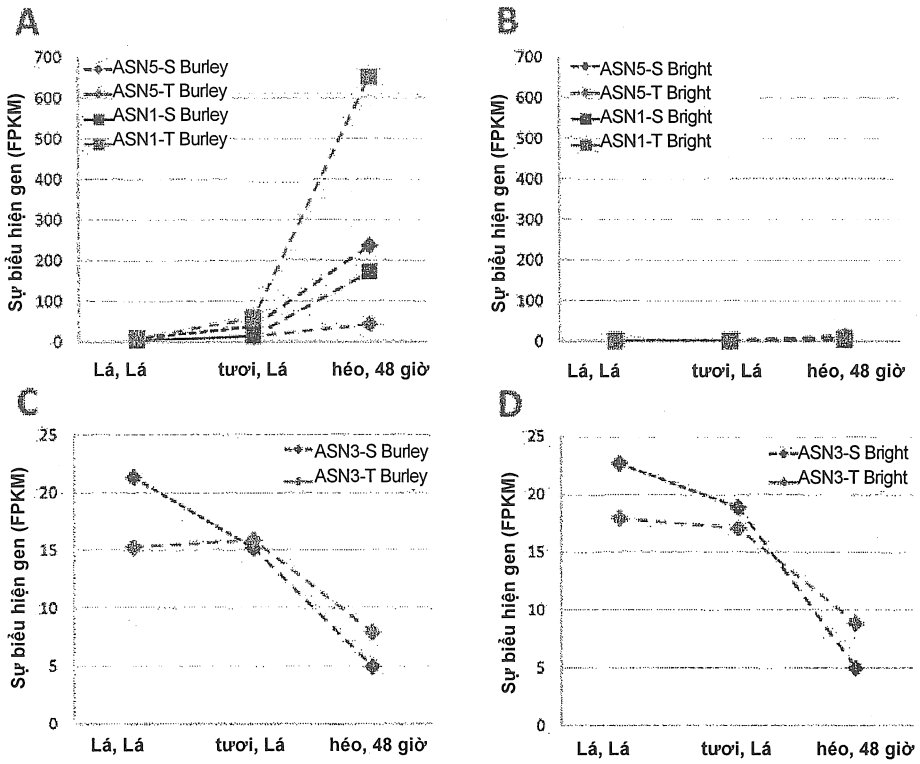

A
B
C
D
Sự biểu hiện gen (FPKM)
ASN5-S Burley
ASN5-T Burley
ASN1-S Burley
ASN1-T Burley
ASN5-S Bright
ASN5-T Bright
ASN1-S Bright
ASN1-T Bright
ASN3-S Burley
ASN3-T Burley
ASN3-S Bright
ASN3-T Bright
Lá, Lá
tươi, Lá
héo, 48 giờ

Fig.9

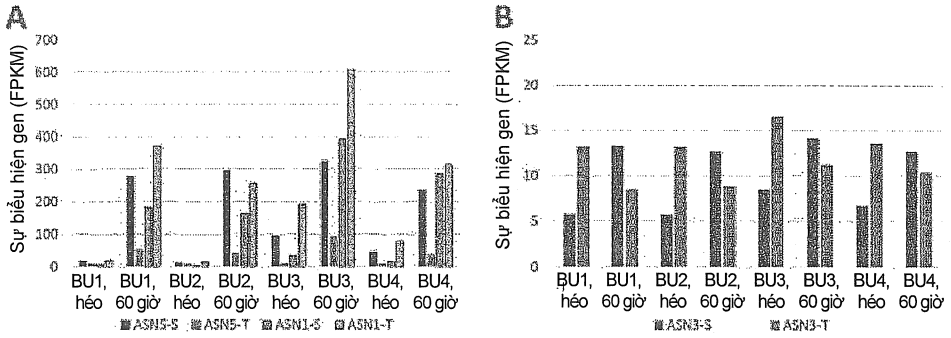

A
Sự biểu hiện gen (FPKM)
700
600
500
400
300
200
100
0
BU1, héo
BU1, 60 giờ
BU2, héo
BU2, 60 giờ
BU3, héo
BU3, 60 giờ
BU4, héo
BU4, 60 giờ
ASN5-S
ASN5-T
ASN1-S
ASN1-T
B
Sự biểu hiện gen (FPKM)
25
20
15
10
5
0
BU1, héo
BU1, 60 giờ
BU2, héo
BU2, 60 giờ
BU3, héo
BU3, 60 giờ
BU4, héo
BU4, 60 giờ
ASN3-S
ASN3-T

Fig.10

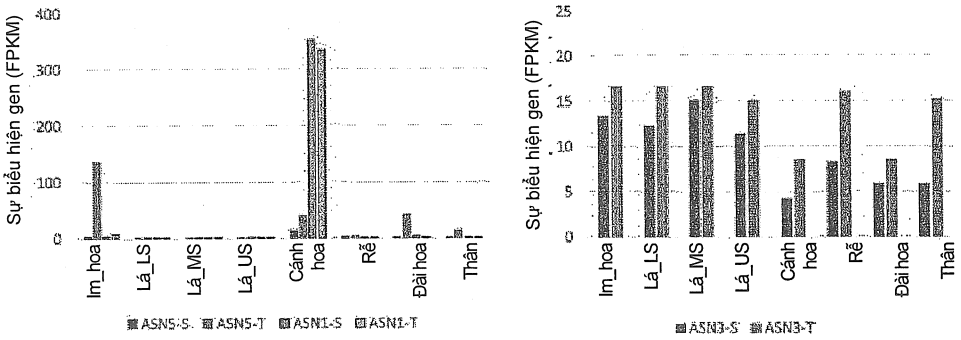

Sự biểu hiện gen (FPKM)
400
300
200
100
0
Im_hoa
Lá_LS
Lá_MS
Lá_US
Cánh hoa
Rễ
Đài hoa
Thân
ASN5-S
ASN5-T
ASN1-S
ASN1-T
Sự biểu hiện gen (FPKM)
25
20
15
10
5
0
Im_hoa
Lá_LS
Lá_MS
Lá_US
Cánh hoa
Rễ
Đài hoa
Thân
ASN3-S
ASN3-T

Fig.11

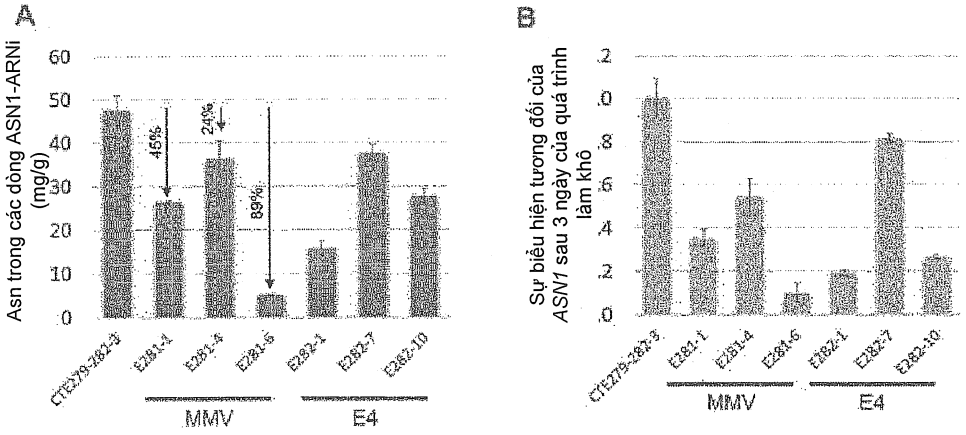

A
Asn trong các dòng ASN1-ARNi (mg/g)
60
50
40
30
20
10
0
45%
24%
89%
CTE279-282-3
E281-1
E281-4
E281-6
E282-1
E282-7
E282-10
MMV
E4
B
Sự biểu hiện tương đối của ASN1 sau 3 ngày của quá trình làm khô
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CTE279-282-3
E281-1
E281-4
E281-6
E282-1
E282-7
E282-10
MMV
E4

Fig.12

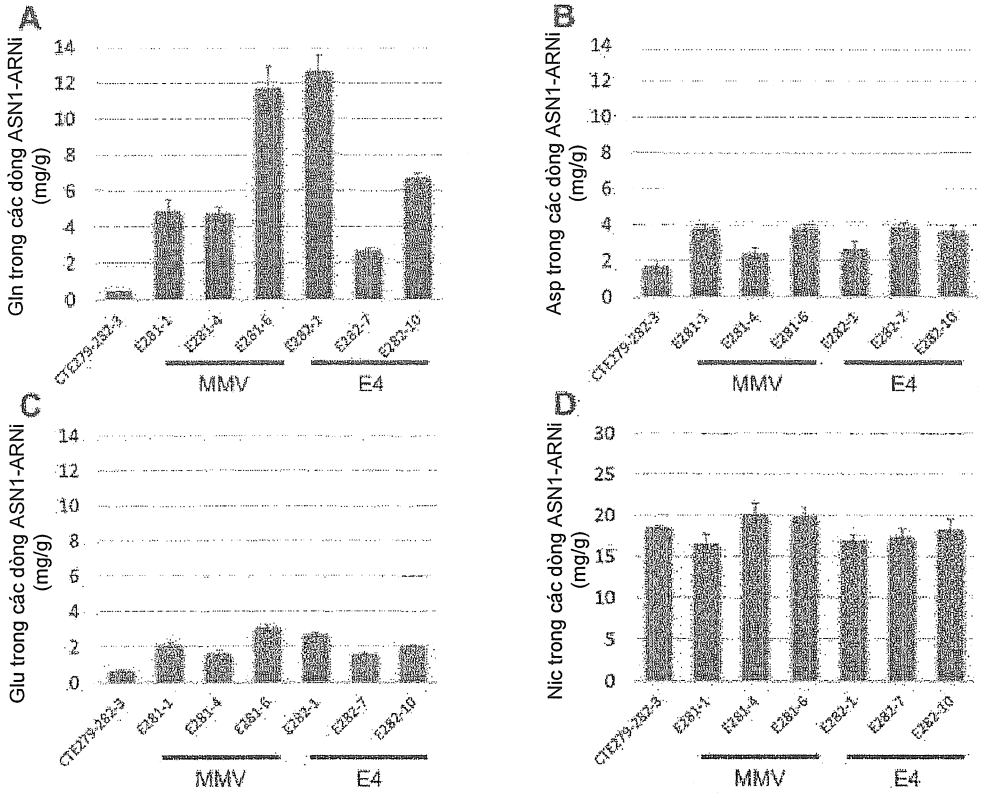

A
Gln trong các dòng ASN1-ARNi (mg/g)
14
12
10
8
6
4
2
0
CTE279-282-3
E281-1
E281-4
E281-6
E282-1
E282-7
E282-10
MMV
E4
B
Asp trong các dòng ASN1-ARNi (mg/g)
C
Glu trong các dòng ASN1-ARNi (mg/g)
D
Nic trong các dòng ASN1-ARNi (mg/g)
30
25
20
15
5

Fig.13

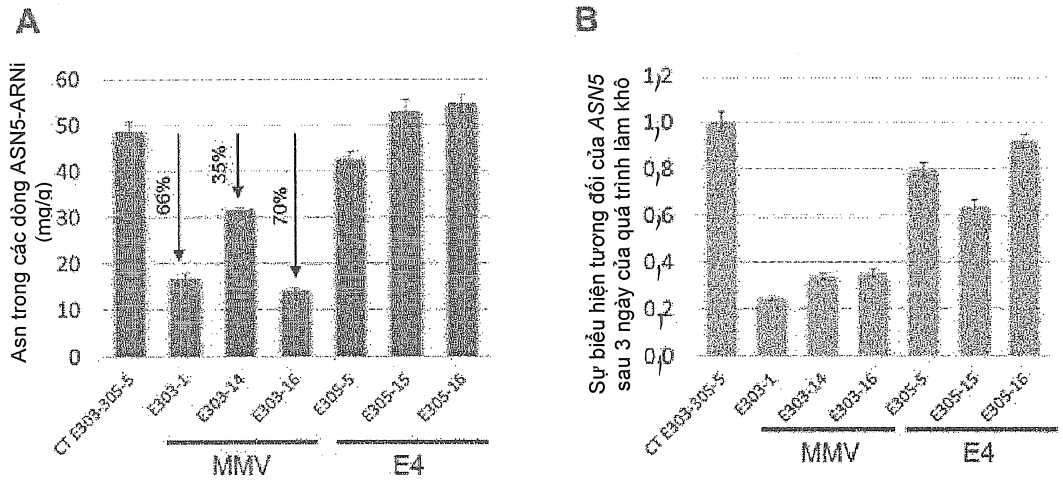

A
Asn trong các dòng ASN5-ARNi (mg/g)
60
50
40
30
20
10
0
66%
35%
70%
CT E303-305-5
E303-1
E303-14
E303-16
E305-5
E305-15
E305-16
MMV
E4
B
Sự biểu hiện tương đối của ASN5 sau 3 ngày của quá trình làm khô
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
CT E303-305-5
E303-1
E303-14
E303-16
E305-5
E305-15
E305-16
MMV
E4

Fig.14

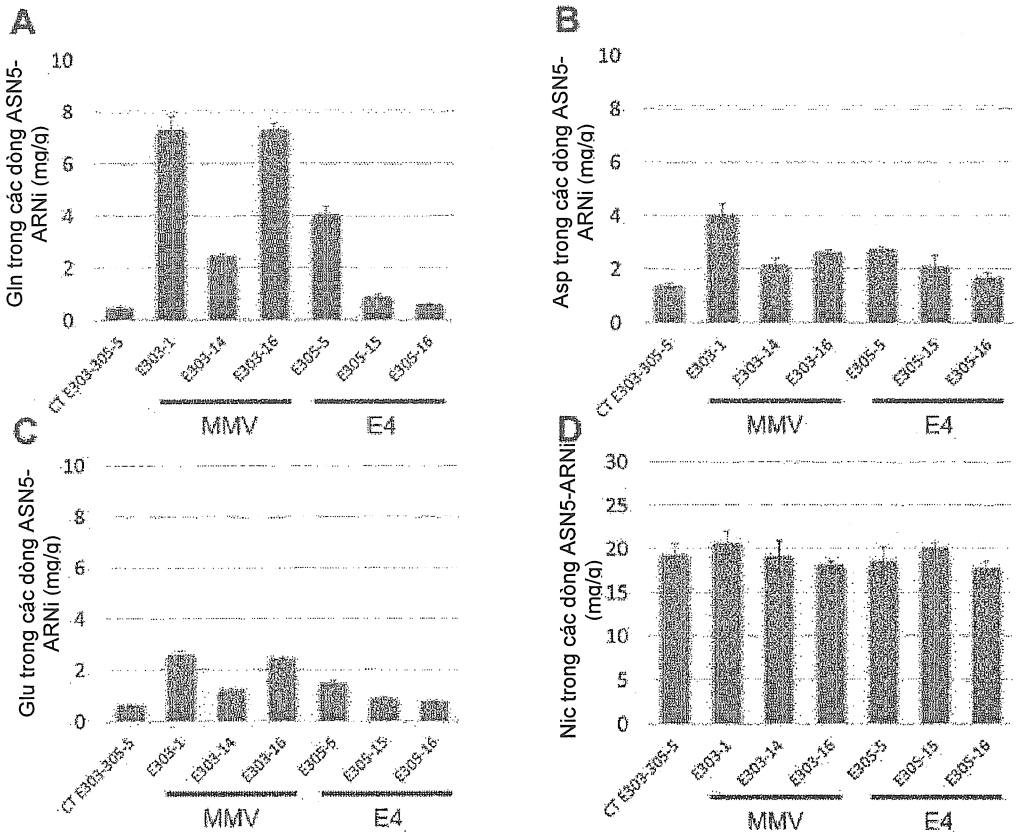

A
Gln trong các dòng ASN5-ARNi (mg/g)
10
8
6
4
2
0
CT E303-305-5
E303-1
E303-14
E303-16
E305-5
E305-15
E305-16
MMV
E4
B
Asp trong các dòng ASN5-ARNi (mg/g)
C
Glu trong các dòng ASN5-ARNi (mg/g)
D
Nic trong các dòng ASN5-ARNi (mg/g)
30
25
20
15

Fig.15

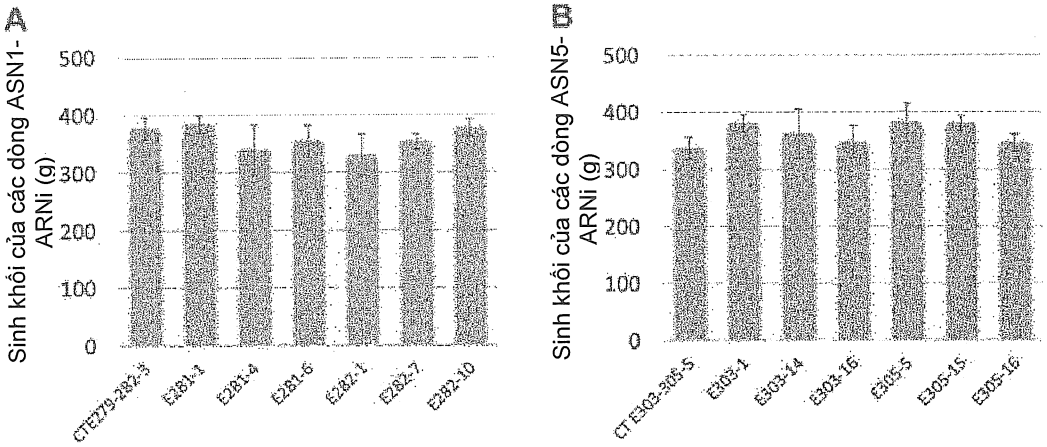

A
Sinh khối của các dòng ASN1-ARNi (g)
500
400
300
200
100
0
CTE279-282-3
E281-1
E281-4
E281-6
E282-1
E282-7
E282-10
B
Sinh khối của các dòng ASN5-ARNi (g)
500
400
300
200
100
0
CT E303-305-5
E303-1
E303-14
E303-16
E305-5
E305-15
E305-16

Fig.16

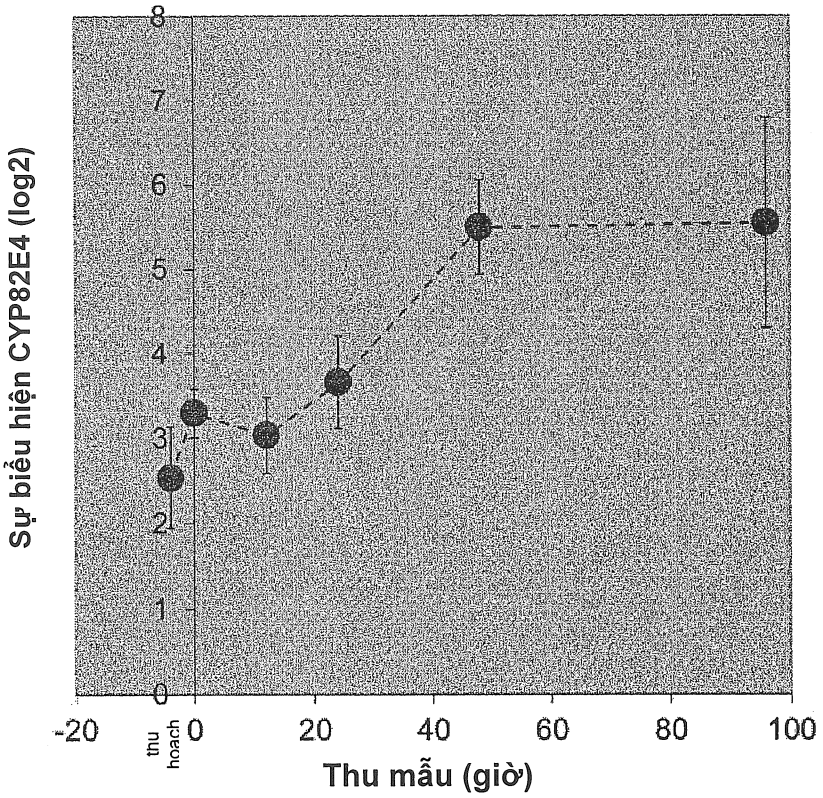

Sự biểu hiện CYP82E4 (log2)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
-20
thu hoạch
0
20
40
60
80
100
Thu mẫu (giờ)

Fig.17

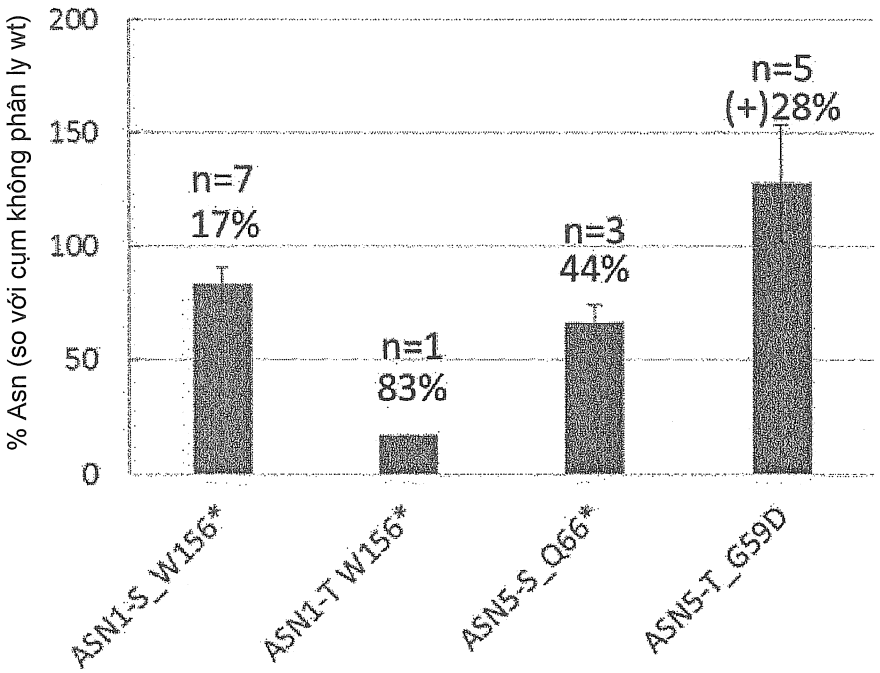

% Asn (so với cụm không phân ly wt)
200
150
100
50
0
n=7
17%
n=1
83%
n=3
44%
n=5
(+)28%
ASN1-S_W156*
ASN1-T W156*
ASN5-S_Q66*
ASN5-T_G59D

Fig.18

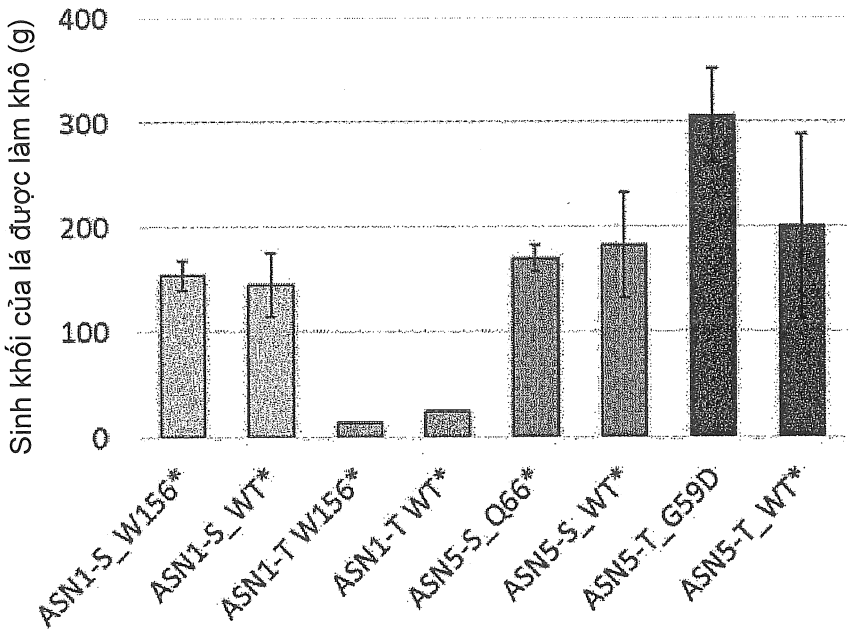

Sinh khối của lá được làm khô (g)
400
300
200
100
0
ASN1-S_W156*
ASN1-S_WT*
ASN1-T W156*
ASN1-T WT*
ASN5-S_Q66*
ASN5-S_WT*
ASN5-T_G59D
ASN5-T_WT*

Fig.19

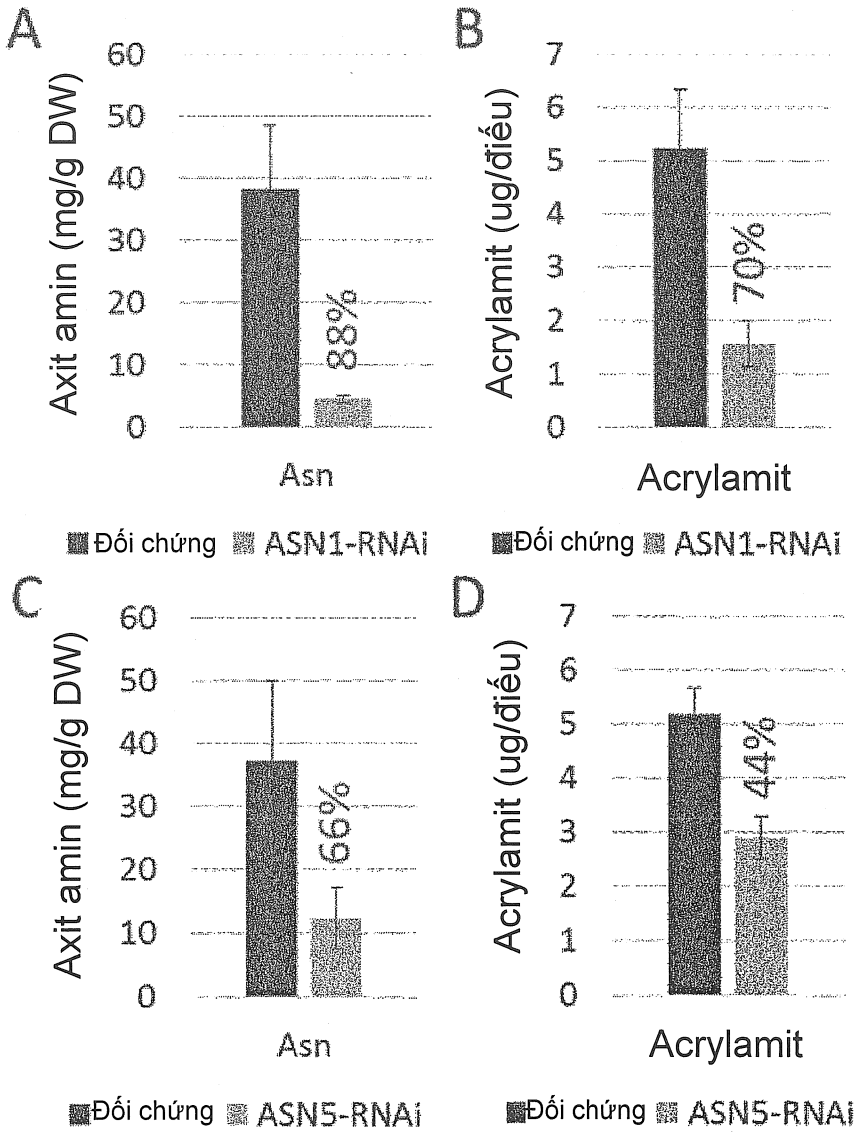

A
Axit amin (mg/g DW)
60
50
40
30
20
10
0
88%
Asn
Đối chứng
ASN1-RNAi
B
Acrylamit (ug/điếu)
7
6
5
4
3
2
1
0
70%
Acrylamit
Đối chứng
ASN1-RNAi
C
Axit amin (mg/g DW)
60
50
40
30
20
10
0
66%
Asn
Đối chứng
ASN5-RNAi
D
Acrylamit (ug/điếu)
7
6
5
4
3
2
1
0
44%
Acrylamit
Đối chứng
ASN5-RNAi

Fig.20

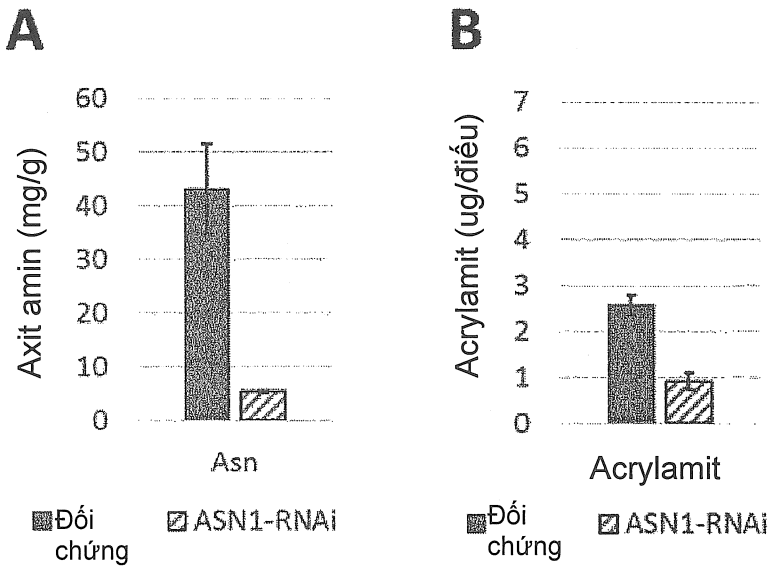

A
Axit amin (mg/g)
60
50
40
30
20
10
0
Asn
Đối chứng
ASN1-RNAi
B
Acrylamit (ug/điếu)
7
6
5
4
3
2
1
0
Acrylamit
Đối chứng
ASN1-RNAi

Fig.21

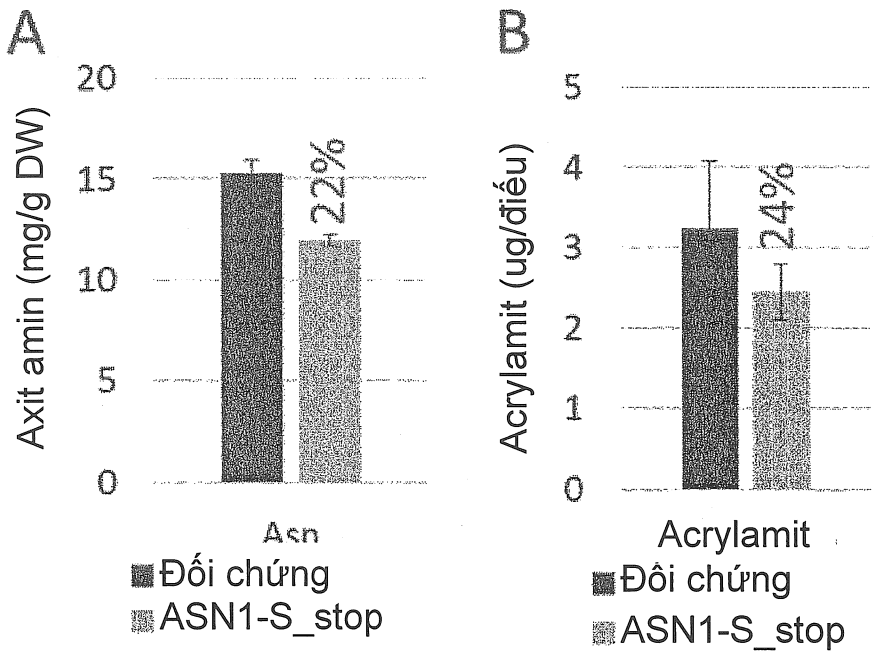
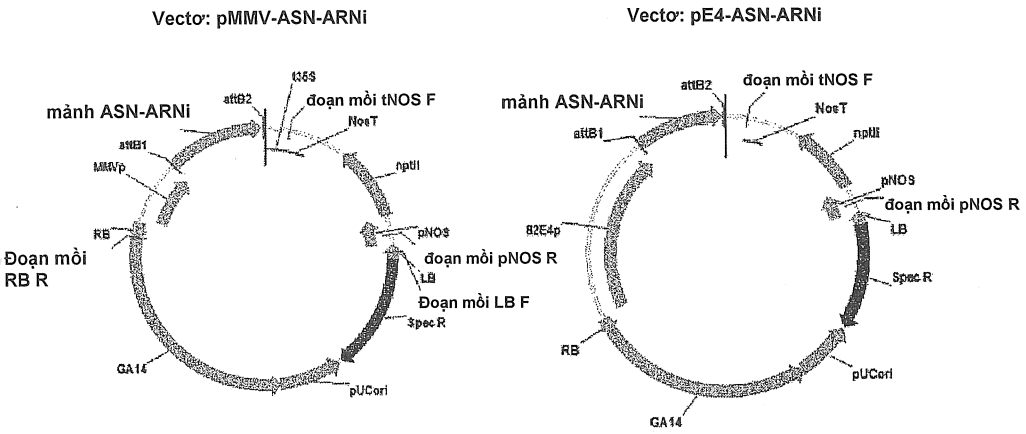

A
Axit amin (mg/g DW)
20
15
10
5
0
22%
Asn
Đối chứng
ASN1-S_stop
B
Acrylamit (ug/điếu)
5
4
3
2
1
0
24%
Acrylamit
Đôi chứng
ASN1-S_stop

Fig.22


Vecto: pMMV-ASN-ARNi
mảnh ASN-ARNi
attB2
t35$
đoạn mồi tNOS F
NosT
attB1
MMVp
nptII
RB
pNOS
Đoạn mồi
RB R
đoạn mồi pNOS R
LB
Đoạn mồi LB F
SpecR
GA14
pUCori
Vecto: pE4-ASN-ARNi
mảnh ASN-ARNi
attB2
đoạn mồi tNOS F
NosT
attB1
nptII
pNOS
đoạn mồi pNOS R
LB
E4p
SpecR
RB
pUCori
GA14