



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0037948

(51)⁸ C12N 15/82; C07K 14/415

(13) B

(21) 1-2018-04228

(22) 08/03/2017

(86) PCT/US2017/021310 08/03/2017

(87) WO2017/156091 14/09/2017

(30) 62/306,790 11/03/2016 US

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/12/2018 369A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis, Missouri 63167, United States of America

(72) CHITTOOR, Jaishree, M. (US); FLASINSKI, Stanislaw (US); OUFATTOLE, Mohammed (US); PETERSEN, Michael, W. (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP VÀ THỰC VẬT VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT
CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề xuất phân tử và cấu trúc ADN tái tổ hợp, cũng như các trình tự nucleotit của chúng, hữu ích để điều hòa sự biểu hiện gen ở thực vật. Sáng chế còn đề xuất thực vật chuyển gen, tế bào thực vật, bộ phận thực vật, và hạt giống chứa phân tử ADN tái tổ hợp được liên kết chức năng với phân tử ADN khác loại phiên mã được, cũng như các quy trình sử dụng chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử thực vật; và thao tác di truyền thực vật. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các phân tử ADN hữu ích để điều hòa sự biểu hiện gen ở thực vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các yếu tố điều hòa là các yếu tố di truyền điều hòa hoạt động của gen bằng cách điều biến sự phiên mã của phân tử ADN phiên mã được liên kết chức năng. Các yếu tố này có thể bao gồm các trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu, intron, và các vùng 3' không dịch mã và là hữu ích trong lĩnh vực sinh học phân tử thực vật và thao tác di truyền thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất đến các yếu tố điều hòa gen mới để sử dụng ở thực vật. Sáng chế cũng đề xuất các cấu trúc ADN chứa các yếu tố điều hòa này. Sáng chế còn đề xuất các tế bào thực vật chuyển gen, thực vật, và hạt giống chứa các yếu tố điều hòa này. Trong một phương án, các yếu tố điều hòa được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được. Trong một số phương án, phân tử ADN phiên mã được có thể là khác loại đối với trình tự điều hòa. Do đó, trình tự yếu tố điều hòa được đề xuất bởi sáng chế có thể, trong nhiều phương án cụ thể, được định nghĩa là được liên kết chức năng với phân tử ADN khác loại phiên mã được. Sáng chế còn đề xuất các phương pháp tạo ra và sử dụng các yếu tố điều hòa, các cấu trúc ADN chứa các yếu tố điều hòa này, và các tế bào thực vật chuyển gen, thực vật, và hạt giống chứa các yếu tố điều hòa được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 85 phần trăm với bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15; (b) trình tự chứa bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15; và (c) đoạn thuộc bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự này được liên kết chức năng với

phân tử ADN khác loại phiên mã được. Thuật ngữ “phân tử ADN khác loại phiên mã được” có nghĩa là phân tử ADN phiên mã được này là khác loại đối với trình tự polynucleotit mà nó được liên kết chức năng vào. Trong các phương án cụ thể, phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN có độ đồng nhất trình tự ít nhất là khoảng 90 phần trăm, ít nhất là 91 phần trăm, ít nhất là 92 phần trăm, ít nhất là 93 phần trăm, ít nhất là 94 phần trăm, ít nhất là 95 phần trăm, ít nhất là 96 phần trăm, ít nhất là 97 phần trăm, ít nhất là 98 phần trăm, hoặc ít nhất là 99 phần trăm với trình tự ADN của bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15. Trong nhiều phương án cụ thể, trình tự ADN này chứa yếu tố điều hòa. Trong một số phương án, yếu tố điều hòa này bao gồm trình tự khởi động. Vẫn trong các phương án khác, phân tử ADN khác loại phiên mã được chứa gen cần quan tâm về mặt nông học, như gen có khả năng tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ ở thực vật, hoặc gen có khả năng tạo ra tính kháng sâu hại cây ở thực vật. Vẫn trong các phương án khác, sáng chế đề xuất cấu trúc chứa phân tử ADN tái tổ hợp như được đề xuất ở đây.

Theo một khía cạnh khác, được đề xuất ở đây là các tế bào thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất khoảng 85 phần trăm với bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15; (b) trình tự chứa bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15; và (c) đoạn thuộc bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự ADN này được liên kết chức năng với phân tử ADN khác loại phiên mã được. Trong một số phương án, tế bào thực vật chuyển gen là tế bào thực vật một lá mầm. Trong các phương án khác, tế bào thực vật chuyển gen là tế bào thực vật một lá mầm hoặc tế bào thực vật hai lá mầm.

Theo một khía cạnh khác nữa, được đề xuất thêm ở đây là thực vật chuyển gen, hoặc một bộ phận của chúng, chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: a) trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85 phần trăm với bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15; b) trình tự chứa bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15; và c) đoạn thuộc bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1-15, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự này được liên kết chức năng với phân tử ADN khác loại phiên mã được. Trong các phương án cụ thể, thực vật chuyển gen là cây con của thế hệ bất kỳ mang phân tử ADN tái tổ hợp. Hạt giống chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp sản sinh ra thực vật chuyển gen này khi được trồng cũng được đề xuất ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất quy trình sản xuất thương phẩm bao

gồm thu được thực vật chuyển gen hoặc một bộ phận của chúng chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế và sản xuất ra thương phẩm từ đó. Trong một phương án, thương phẩm này là hạt giống đã được xử lý, hạt ngũ cốc, các bộ phận của thực vật, dầu và bột.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất quy trình tạo ra thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm biến nạp tế bào thực vật bằng phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế để tạo ra tế bào thực vật đã biến nạp và tái tạo thực vật chuyển gen từ tế bào thực vật đã biến nạp này.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 là trình tự ADN của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa (EXP) bao gồm trình tự khởi động thu được từ gen protein Ferredoxin 2 (Fe2) giả định của *Cucumis melo* được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

SEQ ID NO: 2 là trình tự khởi động thu được từ gen protein Ferredoxin 2 (Fe2) giả định của *Cucumis melo*.

SEQ ID NO: 3 là trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein Ferredoxin 2 (Fe2) giả định của *Cucumis melo*.

SEQ ID NO: 4 là trình tự ADN của EXP bao gồm trình tự khởi động thu được từ gen protein liên kết chất diệt lục a-b 13 của *Cucumis melo* được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

SEQ ID NO: 5 là trình tự khởi động thu được từ gen protein liên kết chất diệt lục a-b 13 của *Cucumis melo*.

SEQ ID NO: 6 là trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein liên kết chất diệt lục a-b 13 của *Cucumis melo*.

SEQ ID NO: 7 là trình tự ADN của EXP bao gồm trình tự khởi động thu được từ gen tương tự protein ngón tay kẽm hộp-B 24 của *Cucumis melo* được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

SEQ ID NO: 8 là trình tự khởi động thu được từ gen tương tự protein ngón tay kẽm hộp-B 24 của *Cucumis melo*.

SEQ ID NO: 9 là trình tự dẫn đầu thu được từ gen tương tự protein ngón tay kẽm hộp-B 24 của *Cucumis melo*.

SEQ ID NO: 10 là trình tự ADN của EXP bao gồm trình tự khởi động thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula* được liên kết chức năng

5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

SEQ ID NO: 11 là trình tự khởi động thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO: 12 là trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO: 13 là trình tự ADN của EXP bao gồm trình tự khởi động thu được từ gen tiền thân lục lạp hệ quang hóa II của *Medicago truncatula* được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

SEQ ID NO: 14 là trình tự khởi động thu được từ gen tiền thân lục lạp hệ quang hóa II của *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO: 15 là trình tự khởi động trình tự dẫn đầu thu được từ gen tiền thân lục lạp hệ quang hóa II của *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO: 16 là trình tự tăng cường thu được từ trình tự khởi động của gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO: 17 là trình tự mã hóa cho β -glucuronidaza (GUS) với intron xử lý được.

SEQ ID NO: 18 là trình tự 3' UTR thu được từ gen E6 của *Gossypium barbadense*.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen ở thực vật. Các trình tự nucleotit của các phân tử ADN này được đề xuất là các SEQ ID NO: 1-15. Các phân tử ADN này có khả năng tác động đến sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng trong mô thực vật, và do đó điều hòa sự biểu hiện gen của gen chuyển được liên kết chức năng ở thực vật chuyển gen. Sáng chế còn đề xuất các quy trình biến đổi, sản xuất, và sử dụng các phân tử này. Sáng chế còn đề xuất các chế phẩm chứa tế bào thực vật chuyển gen, thực vật, các bộ phận thực vật, và hạt giống chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế, và các quy trình tạo ra và sử dụng chúng.

Các định nghĩa và các phương pháp sau đây được cung cấp để hiểu rõ hơn sáng chế và để hướng dẫn người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này trong việc thực hành sáng chế. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực có liên quan.

Các phân tử ADN

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ADN” hoặc “phân tử ADN” đề cập đến phân tử ADN chuỗi kép có nguồn gốc từ bộ gen hoặc tổng hợp, nghĩa là polyme của các bazo deoxyribonucleotit hoặc phân tử ADN, đọc từ đầu 5’ (ngược dòng) đến đầu 3’ (xuôi dòng). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự ADN” đề cập đến trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng ở đây tương ứng với danh pháp của Điều 37 của Bộ pháp điển các quy định liên bang Mỹ (United States Code of Federal Regulations) § 1.822, và được đưa ra trong các bảng trong Tiêu chuẩn WIPO ST.25 (1998), Phụ lục 2, Bảng 1 và 3.

Như được sử dụng ở đây, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN chứa tổ hợp của các phân tử ADN mà không xuất hiện tự nhiên cùng nhau nếu không có sự can thiệp của con người. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp có thể là phân tử ADN mà bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác loại với nhau, phân tử ADN chứa trình tự ADN mà có nguồn gốc từ các trình tự ADN tồn tại trong tự nhiên, hoặc phân tử ADN được đưa vào ADN của tế bào chủ bằng kỹ thuật biến nạp di truyền hoặc biên tập gen.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đồng nhất trình tự” đề cập đến mức độ mà hai trình tự polynucleotit được sắp xếp thẳng hàng tối ưu hoặc hai trình tự polypeptit được sắp xếp thẳng hàng tối ưu là giống nhau. Sự sắp xếp thẳng hàng trình tự tối ưu được tạo ra bằng cách sắp xếp thẳng hàng thủ công hai trình tự, ví dụ, trình tự tham chiếu và một trình tự khác, để làm tăng tối đa số lượng bắt cặp nucleotit trong sắp xếp thẳng hàng trình tự với các gắn xen, mất đoạn nucleotit hoặc các khoảng trống bên trong thích hợp. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự tham chiếu” đề cập đến trình tự ADN được cung cấp giống như trình tự ADN được đưa ra là các SEQ ID NO: 1-15.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “tỉ lệ phần trăm đồng nhất trình tự” hoặc “tỉ lệ phần trăm đồng nhất” hoặc “% đồng nhất” là tỉ lệ đồng nhất nhân với 100. “Tỉ lệ đồng nhất” đối với trình tự được sắp xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự tham chiếu là số lượng các bắt cặp nucleotit khi sắp xếp thẳng hàng tối ưu, chia cho tổng số nucleotit trong trình tự tham chiếu, ví dụ, tổng số nucleotit trên độ dài đầy đủ của toàn bộ trình tự tham chiếu. Do đó, một phương án của sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa trình tự mà, khi được sắp xếp thẳng hàng tối ưu với trình tự tham chiếu, được đưa ra ở đây là các SEQ ID NO: 1-15, có tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 85 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 86 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 87 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 88 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất

là khoảng 89 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 90 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 91 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 92 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 93 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 94 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 95 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 96 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 97 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 98 phần trăm, tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 99 phần trăm, hoặc tỉ lệ phần trăm đồng nhất ít nhất là khoảng 100 phần trăm với trình tự tham chiếu.

Các yếu tố điều hòa

Các yếu tố điều hòa như trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu (còn được gọi là 5' UTR), các yếu tố tăng cường, intron, và các vùng kết thúc phiên mã (hoặc 3' UTR) đóng vai trò thiết yếu trong sự biểu hiện chung của các gen trong tế bào sống. Thuật ngữ “yếu tố điều hòa”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen. Thuật ngữ “hoạt tính điều hòa gen”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến khả năng tác động đến sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được liên kết chức năng, ví dụ, bằng cách tác động đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của phân tử ADN phiên mã được liên kết chức năng. Các yếu tố điều hòa, như trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu, yếu tố tăng cường, intron và 3' UTR mà hoạt động ở thực vật do đó là hữu ích để biến đổi kiểu hình thực vật nhờ thao tác di truyền.

Như được sử dụng ở đây, “nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa” hoặc trình tự “EXP” có thể đề cập đến nhóm các yếu tố điều hòa được liên kết chức năng, như yếu tố tăng cường, trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu, và các intron. Do đó, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa có thể bao gồm, ví dụ, trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu. EXP hữu ích trong thực hành sáng chế bao gồm 1, 4, 7, 10, và 13.

Các yếu tố điều hòa có thể được đặc trưng bởi kiểu biểu hiện gen của chúng, ví dụ, các tác động tích cực và/hoặc tiêu cực như biểu hiện mặc định hoặc biểu hiện đáp ứng thời gian, không gian, sự phát triển, mô, môi trường, sinh lý, bệnh lý, chu kỳ tế bào và/hoặc sự biểu hiện đáp ứng hóa học, và tổ hợp bất kỳ của chúng, cũng như bởi các chỉ số định tính hoặc định lượng. Như được sử dụng ở đây, “kiểu biểu hiện gen” là kiểu phiên mã bất kỳ của phân tử ADN được liên kết chức năng thành phân tử ARN được phiên mã. Phân tử ARN được phiên mã có thể được dịch mã để tạo ra phân tử protein hoặc có thể cung cấp phân tử ARN đối nghĩa hoặc phân tử ARN điều hòa khác, như ARN

chuỗi kép (dsARN), ARN vận chuyển (tARN), ARN ribosom (rARN), microARN (miARN), và tương tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “sự biểu hiện protein” là kiểu dịch mã bất kỳ của phân tử ARN được phiên mã thành phân tử protein. Sự biểu hiện protein có thể được đặc trưng bởi các đặc tính về thời gian, không gian, sự phát triển hoặc hình thái học của nó, cũng như là bởi các chỉ số định tính hoặc định lượng.

Trình tự khởi động là hữu ích để làm yếu tố điều hòa để điều hòa sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự khởi động” đề cập chung đến phân tử ADN tham gia vào việc nhận biết và liên kết của ARN polymeraza II và các protein khác, như các yếu tố phiên mã hoạt động trans, để khởi động phiên mã. Trình tự khởi động có thể được phân lập ban đầu từ vùng 5' không dịch mã (5' UTR) của bản sao bộ gen của gen. Ngoài ra, trình tự khởi động có thể là phân tử ADN được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc phân tử ADN được xử lý. Trình tự khởi động cũng có thể là khảm. Trình tự khởi động khảm được tạo ra bằng cách dung hợp hai hoặc nhiều phân tử ADN khác loại. Các trình tự khởi động hữu ích trong thực hành sáng chế bao gồm các yếu tố khởi động nằm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14, hoặc các đoạn hoặc biến thể của chúng. Trong các phương án cụ thể theo sáng chế, các phân tử ADN theo sáng chế và các biến thể hoặc dẫn xuất bất kỳ của chúng như được mô tả ở đây, được xác định thêm là bao gồm hoạt tính trình tự khởi động, nghĩa là có khả năng hoạt động như là trình tự khởi động trong tế bào chủ, như trong thực vật chuyển gen. Vẫn trong các phương án cụ thể khác, một đoạn có thể được xác định là thể hiện hoạt tính trình tự khởi động của phân tử trình tự khởi động ban đầu mà từ đó thu được nó, hoặc một đoạn có thể bao gồm “trình tự khởi động tối thiểu” mà tạo ra sự phiên mã ở mức nền và bao gồm hộp TATA, motif vị trí liên kết yếu tố phiên mã đã biết khác, hoặc trình tự ADN tương đương để nhận biết và liên kết của phức hợp ARN polymeraza II để khởi động phiên mã.

Trong một phương án, các đoạn của trình tự khởi động đã mô tả ở đây được đề xuất. Các đoạn trình tự khởi động có thể có hoạt tính trình tự khởi động, như được mô tả trên đây, và có thể là hữu ích một mình hoặc kết hợp với các trình tự khởi động và các đoạn trình tự khởi động khác, như để tạo ra các trình tự khởi động khảm, hoặc kết hợp với các EXP và các đoạn EXP khác. Trong các phương án cụ thể, các đoạn của trình tự khởi động được đề xuất chứa ít nhất là khoảng 50, ít nhất là khoảng 75, ít nhất là khoảng

95, ít nhất là khoảng 100, ít nhất là khoảng 125, ít nhất là khoảng 150, ít nhất là khoảng 175, ít nhất là khoảng 200, ít nhất là khoảng 225, ít nhất là khoảng 250, ít nhất là khoảng 275, ít nhất là khoảng 300, ít nhất là khoảng 500, ít nhất là khoảng 600, ít nhất là khoảng 700, ít nhất là khoảng 750, ít nhất là khoảng 800, ít nhất là khoảng 900, hoặc ít nhất là khoảng 1000 nucleotit liên tục, hoặc dài hơn, của phân tử ADN có hoạt tính trình tự khởi động như được mô tả ở đây. Trong một số phương án, sáng chế đề xuất các đoạn thuộc bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 1-15, có hoạt tính của trình tự có độ dài đầy đủ. Các phương pháp để tạo ra các đoạn này từ phân tử trình tự khởi động ban đầu là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các chế phẩm thu được từ bất kỳ trong số các yếu tố khởi động được bao gồm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14, như các đột biến mất đoạn bên trong hoặc đột biến mất đoạn 5', ví dụ, có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các quy trình đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để cải thiện hoặc thay đổi sự biểu hiện, bao gồm bằng cách loại bỏ các yếu tố có ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực trên sự biểu hiện; nhân đôi các yếu tố có ảnh hưởng tích cực hoặc tiêu cực trên sự biểu hiện; và/hoặc nhân đôi hoặc loại bỏ các yếu tố có tác động đặc hiệu mô hoặc tế bào trên sự biểu hiện. Các chế phẩm thu được từ bất kỳ trong số các yếu tố khởi động được bao gồm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14 chứa các đột biến mất đoạn 3' trong đó yếu tố hộp TATA hoặc trình tự tương đương của nó và trình tự xuôi dòng được loại bỏ có thể được sử dụng, ví dụ, để tạo ra các yếu tố tăng cường. Các đột biến mất đoạn khác có thể được tạo ra để loại bỏ các yếu tố bất kỳ có tác động tích cực hoặc tiêu cực; tác động đặc hiệu mô; đặc hiệu tế bào; hoặc đặc hiệu thời gian (như, nhưng không giới hạn ở, nhịp ngày đêm) trên sự biểu hiện. Bất kỳ trong số các yếu tố khởi động được bao gồm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14 và các đoạn hoặc yếu tố tăng cường thu được từ đó có thể được sử dụng để tạo ra các chế phẩm yếu tố điều hòa phiên mã khảm.

Theo sáng chế, trình tự khởi động hoặc đoạn trình tự khởi động có thể được phân tích về sự có mặt của các yếu tố khởi động đã biết, nghĩa là các đặc điểm về trình tự ADN, như hộp TATA và các motif vị trí liên kết yếu tố phiên mã đã biết khác. Kỹ thuật nhận diện các yếu tố khởi động đã biết này có thể được sử dụng bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này để thiết kế các biến thể của trình tự khởi động mà có kiểu biểu hiện tương tự với trình tự khởi động ban đầu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự dẫn đầu” đề cập đến phân tử ADN

được phân lập từ vùng 5' không dịch mã (5' UTR) của gen và thường được xác định là đoạn nucleotit nằm giữa vị trí khởi động phiên mã (TSS) và vị trí khởi động trình tự mã hóa protein. Ngoài ra, trình tự dẫn đầu có thể là yếu tố ADN được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc yếu tố ADN được xử lý. Trình tự dẫn đầu có thể được sử dụng làm yếu tố điều hòa 5' để điều hòa sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng. Các phân tử dẫn đầu có thể được sử dụng với trình tự khởi động khác loại hoặc trình tự khởi động tự nhiên của chúng. Trình tự dẫn đầu hữu ích trong thực hành sáng chế bao gồm các SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, và 15 hoặc bất kỳ trong số các yếu tố dẫn đầu nằm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, và 13 hoặc các đoạn hoặc biến thể của chúng. Trong các phương án cụ thể, các trình tự ADN này có thể được xác định là có khả năng hoạt động như trình tự dẫn đầu trong tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, tế bào thực vật chuyển gen. Trong một phương án, các trình tự này được giải mã vì có hoạt tính trình tự dẫn đầu.

Các trình tự dẫn đầu (còn được gọi là 5' UTR) được thể hiện bằng các SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, và 15 hoặc bất kỳ trong số các yếu tố dẫn đầu nằm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, và 13 có thể chứa các yếu tố điều hòa, hoặc có thể mang các cấu trúc bậc hai mà có thể có tác động trên sự phiên mã hoặc dịch mã của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng. Các trình tự dẫn đầu được thể hiện bằng các SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, và 15 hoặc bất kỳ trong số các yếu tố dẫn đầu nằm trong bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, và 13 có thể được sử dụng theo sáng chế để tạo ra các yếu tố điều hòa khả năng mà tác động đến sự phiên mã hoặc dịch mã của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “intron” đề cập đến phân tử ADN mà có thể được phân lập hoặc được nhận diện từ gen và có thể được xác định chung là vùng được cắt ra trong quá trình xử lý ARN thông tin (mARN) trước khi dịch mã. Ngoài ra, intron có thể là yếu tố ADN được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc yếu tố ADN được xử lý. Intron có thể chứa các yếu tố tăng cường tác động đến sự phiên mã của các gen được liên kết chức năng. Intron có thể được sử dụng làm yếu tố điều hòa để điều hòa sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng. Một cấu trúc có thể chứa intron, và intron này có thể hoặc không thể là khác loại với phân tử ADN phiên mã được. Ví dụ về các intron trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm intron actin lúa và intron HSP70 ngô.

Ở thực vật, việc đưa một số intron vào các cấu trúc gen dẫn đến sự tích lũy mRNA và protein tăng so với các cấu trúc thiếu các intron này. Tác động này được gọi là “sự tăng cường do intron” (IME) của sự biểu hiện gen. Các intron đã biết là kích thích sự biểu hiện ở thực vật đã được nhận diện ở các gen ngô (ví dụ, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, và *Ubi1*), ở các gen lúa (ví dụ, *tpi*) và ở các gen của cây hai lá mầm như các gen từ cây Dạ Yến Thảo (ví dụ, *rbcS*), khoai tây (ví dụ, *st-ls1*) và từ *Arabidopsis thaliana* (ví dụ, *ubq3* và *pat1*). Đã được chỉ ra là các đột biến mất đoạn hoặc các đột biến nằm ở các vị trí cắt nối của intron làm giảm sự biểu hiện gen, chỉ ra là sự cắt nối có thể là cần thiết cho IME. Tuy nhiên, IME ở cây hai lá mầm đã được thể hiện bằng các đột biến điểm ở các vị trí cắt nối của gen *pat1* từ *A. thaliana*. Nhiều lần sử dụng cùng một intron ở một thực vật đã được chỉ ra là có các nhược điểm. Trong các trường hợp này, cần phải có tập hợp các yếu tố điều khiển cơ bản để tạo ra các yếu tố ADN tái tổ hợp thích hợp.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ “phân tử kết thúc phiên mã 3'”, “vùng không dịch mã 3'” hoặc “3' UTR” đề cập đến phân tử ADN được sử dụng trong quá trình phiên mã thành vùng không dịch mã của phần 3' của phân tử mRNA. Vùng không dịch mã 3' của phân tử mRNA có thể được tạo ra bằng cách cắt đặc hiệu và polyadenyl hóa 3', còn được biết là đuôi polyA. 3' UTR có thể được liên kết chức năng với và được đặt xuôi dòng phân tử ADN phiên mã được và có thể bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa và các tín hiệu điều hòa khác có khả năng tác động đến sự phiên mã, xử lý mRNA, hoặc biểu hiện gen. Các đuôi polyA được cho là có tác dụng ổn định mRNA và khởi động quá trình dịch mã. Ví dụ về các phân tử kết thúc phiên mã 3' trong lĩnh vực kỹ thuật này là vùng nopaline synthase 3'; vùng hsp17 3' lúa mì, vùng 3' tiểu đơn vị nhỏ rubisco đậu xanh, vùng E6 3' bông, và 3' UTR coixin.

3' UTR thường được sử dụng có lợi cho sự biểu hiện tái tổ hợp của các phân tử ADN đặc hiệu. 3' UTR yếu có khả năng tạo ra sự đọc xuyên, mà có thể tác động đến sự biểu hiện của phân tử ADN nằm trong cassette biểu hiện lân cận. Tác dụng điều khiển kết thúc phiên mã thích hợp có thể ngăn cản việc đọc xuyên vào các trình tự ADN (ví dụ, các cassette biểu hiện khác) được đặt xuôi dòng và có thể còn cho phép phục hồi hiệu quả ARN polymeraza để cải thiện sự biểu hiện gen. Sự kết thúc phiên mã hiệu quả (giải phóng ARN Polymeraza II từ ADN) là điều kiện tiên quyết để khởi động lại sự phiên mã và do đó tác động trực tiếp đến mức độ phiên mã chung. Sau khi kết thúc phiên mã, mRNA thành thực được giải phóng từ vị trí tổng hợp và khuôn được vận chuyển đến tế bào chất.

Các mARN tế bào nhân chuẩn được tích lũy như dưới dạng poly(A) *in vivo*, gây khó khăn cho việc phát hiện các vị trí kết thúc phiên mã bằng các phương pháp thông thường. Tuy nhiên, việc dự đoán các 3' UTR hữu ích và hiệu quả bằng các phương pháp tin sinh học là khó khăn ở chỗ không có các trình tự ADN được bảo tồn mà cho phép dự đoán dễ dàng về 3' UTR hiệu quả.

Từ quan điểm thực tiễn, thường có lợi nếu 3' UTR được sử dụng trong caxet biểu hiện có các đặc điểm sau đây. 3' UTR nên có thể kết thúc một cách hiệu quả và hữu hiệu sự phiên mã của gen chuyển và ngăn cản sự đọc xuyên của sản phẩm phiên mã vào trình tự ADN lân cận bất kỳ, mà có thể chứa một caxet biểu hiện khác như trong trường hợp nhiều caxet biểu hiện nằm trong một ADN vận chuyển (T-ADN), hoặc ADN nhiễm sắc thể lân cận mà T-ADN được gắn xen vào đó. 3' UTR không nên gây ra sự giảm hoạt tính phiên mã mà được gây ra bởi trình tự khởi động, trình tự dẫn đầu, yếu tố tăng cường, và các intron mà được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của phân tử ADN. Trong công nghệ sinh học thực vật, 3' UTR thường được sử dụng để mồi các phản ứng khuếch đại của ARN được phiên mã đảo đã chiết ra từ thực vật đã biến nạp và được sử dụng để: (1) đánh giá hoạt tính phiên mã hoặc sự biểu hiện của caxet biểu hiện khi được tích hợp vào nhiễm sắc thể thực vật; (2) đánh giá số lượng bản sao của các đột biến gắn xen bên trong ADN thực vật; và (3) đánh giá tình trạng kết hợp giao tử của hạt giống thu được sau khi gây giống. 3' UTR còn được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại của ADN được chiết ra từ thực vật đã biến nạp để xác định sự không hoạt động của caxet được gắn xen. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự tăng cường” hoặc “yếu tố tăng cường” đề cập đến yếu tố điều hòa hoạt động *cis*, còn được biết là yếu tố *cis*, mà gây ra một khía cạnh của kiểu biểu hiện chung, nhưng một mình nó thường không đủ để điều khiển sự phiên mã, của phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng. Khác với trình tự khởi động, các yếu tố tăng cường thường không bao gồm vị trí khởi động phiên mã (TSS) hoặc hộp TATA hoặc trình tự ADN tương đương. Trình tự khởi động hoặc đoạn trình tự khởi động có thể chứa một cách tự nhiên một hoặc nhiều yếu tố tăng cường mà tác động đến sự phiên mã của trình tự ADN được liên kết chức năng. Yếu tố tăng cường cũng có thể được dung hợp với trình tự khởi động để tạo ra yếu tố-*cis* trình tự khởi động khám, mà gây ra một khía cạnh của sự điều hòa biểu hiện gen chung. Ví dụ về yếu tố tăng cường thu được từ trình tự khởi động gen tiền chất protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula* được đưa ra là SEQ ID NO: 16.

Nhiều yếu tố tăng cường trình tự khởi động được cho là liên kết với các protein liên kết ADN và/hoặc tác động đến cấu trúc liên kết ADN, tạo ra các hình dạng cục bộ mà cho phép hoặc hạn chế một cách chọn lọc sự tiếp cận của ARN polymeraza đến khuôn ADN hoặc tạo thuận lợi cho sự mở chọn lọc chuỗi xoắn kép ở vị trí khởi động phiên mã. Yếu tố tăng cường có thể hoạt động để liên kết với các yếu tố phiên mã mà điều hòa sự phiên mã. Một số yếu tố tăng cường liên kết với nhiều hơn một yếu tố phiên mã, và các yếu tố phiên mã có thể tương tác với các ái lực khác nhau với nhiều hơn một vùng tăng cường. Các yếu tố tăng cường có thể được nhận diện bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm kỹ thuật phân tích gây mất đoạn, nghĩa là làm mất đoạn một hoặc nhiều nucleotit từ đầu 5' hoặc bên trong đến trình tự khởi động; kỹ thuật phân tích protein liên kết ADN bằng cách sử dụng kỹ thuật in dấu ấn DNaza I, kỹ thuật cản trở sự methyl hóa, các thử nghiệm phân tích vị trí di chuyển trong điện di, in dấu ấn bộ gen *in vivo* bằng phản ứng chuỗi polymeraza gây ra bởi sự nổi (PCR), và các thử nghiệm thông thường khác; hoặc bằng phân tích sự tương đồng về trình tự ADN bằng cách sử dụng các motif yếu tố *cis* đã biết hoặc các yếu tố tăng cường làm trình tự đích hoặc motif đích với các phương pháp so sánh trình tự ADN thông thường, như BLAST. Cấu trúc chính xác của vùng tăng cường có thể được nghiên cứu thêm bằng kỹ thuật gây đột biến (hoặc thay thế) một hoặc nhiều nucleotit hoặc bằng các phương pháp thông thường khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các yếu tố tăng cường có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp hóa học hoặc bằng cách phân lập từ các yếu tố điều hòa chứa các yếu tố này, và chúng có thể được tổng hợp với các nucleotit bên sườn bổ sung mà chứa các vị trí enzym giới hạn hữu ích để tạo thuận lợi cho việc thao tác tiếp theo. Do đó, việc thiết kế, tạo ra và sử dụng các yếu tố tăng cường theo các phương pháp được mô tả ở đây để điều hòa sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được liên kết chức năng được bao gồm trong sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khảm” đề cập đến một phân tử ADN duy nhất được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó cả phân tử ADN thứ nhất và thứ hai này bình thường đều không được tìm thấy ở cấu hình này, nghĩa là được dung hợp với nhau. Do đó phân tử ADN khảm là phân tử ADN mới mà bình thường không được tìm thấy trong tự nhiên. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự khởi động khảm” đề cập đến trình tự khởi động được tạo ra bằng cách xử lý các phân tử ADN như vậy. Trình tự khởi động khảm có thể kết hợp hai hoặc nhiều đoạn ADN; ví dụ, dung hợp trình tự khởi động với yếu tố tăng cường. Do đó, việc thiết

kế, tạo ra và sử dụng các trình tự khởi động khảm theo các phương pháp được mô tả ở đây để điều hòa sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được liên kết chức năng là được bao gồm trong sáng chế.

Các yếu tố điều hòa khảm có thể được thiết kế để bao gồm nhiều yếu tố thành phần khác nhau mà có thể được liên kết chức năng bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như phương pháp tiêu hóa bằng enzym giới hạn và nối, phương pháp tách dòng độc lập với việc nối, lắp ráp môđun của các sản phẩm PCR trong quá trình khuếch đại, hoặc phương pháp tổng hợp hóa học trực tiếp yếu tố điều hòa, cũng như các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhiều yếu tố điều hòa khảm khác nhau thu được có thể chứa các yếu tố thành phần giống nhau hoặc các biến thể của các yếu tố thành phần giống nhau này nhưng khác nhau về trình tự ADN hoặc các trình tự ADN mà chứa trình tự ADN nối hoặc các trình tự cho phép các bộ phận thành phần được liên kết chức năng. Theo sáng chế, trình tự ADN được đưa ra là các SEQ ID NO: 1-15 có thể cung cấp trình tự tham chiếu yếu tố điều hòa, trong đó các yếu tố thành phần tạo thành trình tự tham chiếu này có thể được nối bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm các đột biến thế, đột biến mất đoạn, và/hoặc đột biến gắn xen của một hoặc nhiều nucleotit hoặc các đột biến xuất hiện tự nhiên khi biến nạp tế bào vi khuẩn và thực vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến phân tử ADN thứ hai, như yếu tố điều hòa, mà tương tự về thành phần, nhưng không giống với, phân tử ADN thứ nhất, và trong đó phân tử ADN thứ hai này vẫn giữ được chức năng chung của phân tử ADN thứ nhất, nghĩa là kiểu biểu hiện giống hoặc tương tự, ví dụ, nhờ hoạt tính phiên mã nhiều hơn hoặc ít hơn hoặc tương đương. Một biến thể có thể là dạng ngắn hơn hoặc bị cắt của phân tử ADN thứ nhất và/hoặc dạng được biến đổi của trình tự của phân tử ADN thứ nhất, như dạng có nhiều vị trí enzym giới hạn khác nhau và/hoặc các đột biến mất đoạn, đột biến thay thế và/hoặc đột biến gắn xen bên trong. “Biến thể” cũng có thể bao gồm yếu tố điều hòa có trình tự nucleotit chứa đột biến thế, đột biến mất đoạn, và/hoặc đột biến gắn xen của một hoặc nhiều nucleotit của trình tự tham chiếu, trong đó yếu tố điều hòa thu được có hoạt tính dịch mã hoặc phiên mã tương đương hoặc nhiều hơn hoặc ít hơn so với phân tử điều hòa mẹ tương ứng. “Các biến thể” yếu tố điều hòa cũng bao gồm các biến thể sinh ra từ các đột biến xuất hiện tự nhiên trong quá trình biến nạp tế bào vi khuẩn và thực vật. Theo sáng chế, trình tự polynucleotit được đưa ra là các

SEQ ID NO: 1-15 có thể được sử dụng để tạo ra các biến thể tương tự về thành phần, nhưng không giống hệt với, trình tự ADN của yếu tố điều hòa ban đầu, trong khi vẫn giữ được chức năng chung, nghĩa là kiểu biểu hiện giống hoặc tương tự, của yếu tố điều hòa ban đầu. Quy trình sản sinh các biến thể này theo sáng chế đã được biết rõ bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhờ phần mô tả và được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Việc đề cập trong đơn này đến “phân tử ADN được phân lập”, hoặc thuật ngữ hoặc cụm từ tương đương, được dự định có nghĩa là phân tử ADN này là phân tử ADN tồn tại một mình hoặc kết hợp với các thành phần khác, nhưng không nằm trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, các yếu tố axit nucleic như trình tự mã hóa, trình tự intron, trình tự dẫn đầu không được dịch mã, trình tự khởi động, trình tự kết thúc phiên mã, và tương tự, mà được tìm thấy tự nhiên trong ADN của bộ gen của sinh vật không được xem là được “phân lập” khi yếu tố này nằm trong bộ gen của sinh vật và ở vị trí trong bộ gen mà trong đó nó được tìm thấy một cách tự nhiên. Tuy nhiên, mỗi yếu tố này, và tiểu phần của các yếu tố này, sẽ là “được phân lập” trong phạm vi của phần mô tả này khi yếu tố này không nằm trong bộ gen của sinh vật và ở vị trí bên trong bộ gen mà trong đó nó được tìm thấy một cách tự nhiên. Với mục đích của phần mô tả này, trình tự nucleotit chuyển gen bất kỳ, nghĩa là trình tự nucleotit của ADN được gắn xen vào bộ gen của các tế bào thực vật hoặc vi khuẩn, hoặc có mặt trong vectơ ngoài nhiễm sắc thể, sẽ được xem là trình tự nucleotit được phân lập dù nó có mặt trong plasmid hay cấu trúc tương tự được sử dụng để biến nạp các tế bào này, trong bộ gen của thực vật hoặc vi khuẩn, hay có mặt với lượng phát hiện được trong mô, dòng con, các mẫu sinh học hoặc các thương phẩm thu được từ thực vật hoặc vi khuẩn này.

Hiệu quả của các cải biến, lắp đoạn, hoặc mất đoạn được mô tả ở đây trên các khía cạnh biểu hiện mong muốn của một gen chuyển cụ thể có thể được kiểm tra theo kinh nghiệm trong các thử nghiệm thực vật ổn định và tạm thời, như các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ thực hiện ở đây, nhờ đó xác nhận các kết quả, mà có thể thay đổi tùy thuộc vào các thay đổi được tạo ra và mục đích của sự thay đổi này trong phân tử ADN khởi đầu.

Các cấu trúc

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cấu trúc” có nghĩa là phân tử ADN tái tổ hợp bất kỳ như plasmid, cosmit, virus, thể thực khuẩn, hoặc phân tử ARN hoặc ADN thẳng

hoặc vòng, thu được từ nguồn bất kỳ, có khả năng tích hợp vào bộ gen hoặc sao chép tự động, chứa phân tử ADN trong đó ít nhất là một phân tử ADN đã được liên kết với một phân tử ADN khác theo cách hoạt động chức năng, nghĩa là được liên kết chức năng. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vectơ” có nghĩa là cấu trúc bất kỳ mà có thể được sử dụng với mục đích biến nạp, nghĩa là đưa ADN hoặc ARN khác loại vào tế bào chủ. Một cấu trúc thường bao gồm một hoặc nhiều caxet biểu hiện. Như được sử dụng ở đây, “caxet biểu hiện” đề cập đến phân tử ADN chứa ít nhất là một phân tử ADN phiên mã được liên kết chức năng với một hoặc nhiều yếu tố điều hòa, thường ít nhất là trình tự khởi động và 3' UTR.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết chức năng” đề cập đến phân tử ADN thứ nhất được nối với phân tử ADN thứ hai, trong đó các phân tử ADN thứ nhất và thứ hai này được sắp xếp sao cho phân tử ADN thứ nhất tác động đến chức năng của phân tử ADN thứ hai. Hai phân tử ADN này có thể hoặc không thể là một phần của phân tử ADN liên tục duy nhất và có thể hoặc không thể là liền kề. Ví dụ, trình tự khởi động được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được khi trình tự khởi động này điều biến sự phiên mã của phân tử ADN phiên mã được cần quan tâm trong tế bào. Trình tự dẫn đầu, ví dụ, được liên kết chức năng với trình tự ADN khi nó có thể tác động đến sự phiên mã hoặc dịch mã của trình tự ADN này.

Các cấu trúc theo sáng chế có thể được tạo ra, trong một phương án, dưới dạng các cấu trúc bờ plasmit gây khối u (Ti) kép mà có vùng bờ phải (RB hoặc AGRtu.RB) và bờ trái (LB hoặc AGRtu.LB) của plasmit Ti được phân lập từ *Agrobacterium tumefaciens* chứa T-ADN mà, cùng với các phân tử vận chuyển được cung cấp bởi các tế bào *A. tumefaciens*, cho phép tích hợp T-ADN vào bộ gen của tế bào thực vật (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,603,061). Các cấu trúc này cũng có thể chứa các đoạn ADN bộ khung plasmit mà tạo ra chức năng sao chép và lựa chọn kháng sinh ở tế bào vi khuẩn, ví dụ, trình tự ADN đóng vai trò là vị trí khởi đầu sao chép *Escherichia coli* như ori322, trình tự ADN đóng vai trò là vị trí khởi đầu sao chép biên độ vật chủ rộng như oriV hoặc oriRi, và vùng mã hóa cho gen đánh dấu chọn lọc được như Spec/Strp mà mã hóa Tn7 aminoglycosit adenylyltransferaza (*aadA*) gây ra tính kháng với gen đánh dấu lựa chọn được spectinomycin hoặc streptomycin, hoặc gentamicin (Gm, Gent). Để biến nạp thực vật, chủng vi khuẩn chủ thường là *A. tumefaciens* ABI, C58, hoặc LBA4404; tuy nhiên, các chủng khác đã biết đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực biến nạp thực vật

có thể hữu hiệu trong sáng chế.

Các phương pháp là đã biết trong lĩnh vực này để lắp ráp và đưa các cấu trúc vào tế bào theo cách sao cho phân tử ADN phiên mã được được phiên mã thành phân tử mARN chức năng mà được dịch mã và được biểu hiện thành protein. Đối với thực hành theo sáng chế, các chế phẩm thông thường và các phương pháp thông thường để tạo ra và sử dụng các cấu trúc và các tế bào chủ đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Các vectơ điển hình hữu ích cho sự biểu hiện của các axit nucleic ở thực vật bậc cao hơn là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và bao gồm các vectơ thu được từ plasmid Ti của *Agrobacterium tumefaciens* và vectơ điều khiển vận chuyển pCaMVCN.

Nhiều yếu tố điều hòa khác nhau có thể được bao gồm trong một cấu trúc, bao gồm bất kỳ trong số các yếu tố được đề xuất ở đây. Các yếu tố điều hòa bất kỳ này có thể được cung cấp kết hợp với các yếu tố điều hòa khác. Các tổ hợp này có thể được thiết kế hoặc biến đổi để tạo ra các đặc điểm điều hòa mong muốn. Trong một phương án, các cấu trúc theo sáng chế chứa ít nhất là một yếu tố điều hòa được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng với 3' UTR.

Các cấu trúc theo sáng chế có thể bao gồm trình tự khởi động bất kỳ hoặc trình tự dẫn đầu bất kỳ được đưa ra ở đây hoặc được biết đến trong lĩnh vực này. Ví dụ, trình tự khởi động theo sáng chế có thể được liên kết chức năng với trình tự dẫn đầu 5' không dịch mã khác loại như trình tự thu được từ gen protein sốc nhiệt. Ngoài ra, trình tự dẫn đầu theo sáng chế có thể được liên kết chức năng với trình tự khởi động khác loại như trình tự khởi động phiên mã Virut khảm súp lơ 35S.

Các caxet biểu hiện cũng có thể bao gồm trình tự mã hóa peptit vận chuyển mà mã hóa peptit hữu ích cho việc gắn đích dưới mức tế bào của protein được liên kết chức năng, cụ thể là đến lục lạp, vô sắc lạp, hoặc cơ quan bào lạp thể khác; ti thể; peroxisom; không bào; hoặc vị trí ngoại bào. Nhiều protein nằm trong lục lạp được biểu hiện từ các gen nhân dưới dạng các tiền chất và được gắn đích vào lục lạp bởi peptit vận chuyển lục lạp (CTP). Ví dụ về các protein lục lạp được phân lập này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các protein được liên hợp với tiểu đơn vị nhỏ (SSU) của ribuloza-1,5,-bisphosphat carboxylaza, ferredoxin, ferredoxin oxidoreductaza, protein phức hợp thu ánh sáng I và protein phức hợp thu ánh sáng II, thioredoxin F, và enolpyruvyl shikimate phosphat synthaza (EPSPS). Peptit vận chuyển lục lạp đã được mô tả, ví dụ, trong Patent Mỹ số

7,193,133. Đã chứng minh được là các protein không lục lạp có thể được gắn đích vào lục lạp nhờ sự biểu hiện của CTP khác loại được liên kết chức năng với gen chuyển mã hóa các protein không lục lạp.

Phân tử ADN phiên mã được

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân tử ADN phiên mã được" đề cập đến phân tử ADN bất kỳ có khả năng được phiên mã thành phân tử ARN, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phân tử có trình tự mã hóa protein và các phân tử sản sinh ra phân tử ARN có trình tự hữu ích để bắt hoạt gen. Kiểu phân tử ADN có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân tử ADN từ cùng một thực vật, phân tử ADN từ một thực vật khác, phân tử ADN từ một sinh vật khác, hoặc phân tử ADN tổng hợp, như phân tử ADN chứa thông tin đối nghĩa của gen, hoặc phân tử ADN mã hóa dạng nhân tạo, tổng hợp, hoặc dạng được biến đổi của gen chuyển. Các phân tử ADN phiên mã được điển hình để đưa vào các cấu trúc theo sáng chế bao gồm, ví dụ, các phân tử ADN hoặc gen từ một loài khác với loài mà trong đó phân tử ADN này được đưa vào hoặc các gen mà có nguồn gốc từ, hoặc có mặt trong, cùng một loài, nhưng được đưa vào các tế bào nhận bằng các phương pháp thao tác di truyền khác với các kỹ thuật nhân giống cổ điển.

"Gen chuyển" đề cập đến phân tử ADN phiên mã được khác loại với tế bào chủ ít nhất về vị trí của nó trong bộ gen tế bào chủ và/hoặc phân tử ADN phiên mã được được đưa bằng cách nhân tạo vào bộ gen của tế bào chủ trong thể hệ này hoặc thể hệ trước bất kỳ của tế bào này.

Yếu tố điều hòa, như trình tự khởi động theo sáng chế, có thể được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được mà khác loại với yếu tố điều hòa này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "khác loại" đề cập đến tổ hợp của hai hoặc nhiều phân tử ADN khi tổ hợp này bình thường không được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ, hai phân tử ADN có thể thu được từ các loài khác nhau và/hoặc hai phân tử ADN có thể thu được từ các gen khác nhau, ví dụ, các gen khác nhau từ cùng một loài hoặc các gen giống nhau từ các loài khác nhau. Yếu tố điều hòa do đó là khác loại đối với phân tử ADN phiên mã được được liên kết chức năng nếu tổ hợp này bình thường không được tìm thấy trong tự nhiên, nghĩa là phân tử ADN phiên mã được này không xuất hiện một cách tự nhiên ở dạng được liên kết với yếu tố điều hòa này.

Phân tử ADN phiên mã được thường có thể là phân tử ADN bất kỳ mà sự biểu hiện của sản phẩm phiên mã được mong muốn cho nó. Sự biểu hiện này của sản phẩm

phiên mã có thể gây ra sự dịch mã phân tử mRNA thu được, và do đó gây ra sự biểu hiện protein. Ngoài ra, ví dụ, phân tử ADN phiên mã được có thể được thiết kế để cuối cùng gây ra sự giảm biểu hiện của gen hoặc protein đặc hiệu. Trong một phương án, điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phân tử ADN phiên mã được mà được định hướng theo hướng đối nghĩa. Một người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này đã quen thuộc với việc sử dụng công nghệ đối nghĩa này. Gen bất kỳ có thể được điều hòa âm theo cách này, và, trong một phương án, phân tử ADN phiên mã được có thể được thiết kế để bất hoạt một gen cụ thể nhờ sự biểu hiện của phân tử dsARN, siARN hoặc miARN.

Do đó, một phương án của sáng chế là phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố điều hòa theo sáng chế, như các phân tử được đề xuất là SEQ ID NO: 1-15, được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được khác loại để điều hòa sự phiên mã của phân tử ADN phiên mã được này ở mức độ mong muốn hoặc theo kiểu mong muốn khi cấu trúc này được tích hợp vào bộ gen của tế bào thực vật chuyển gen. Trong một phương án, phân tử ADN phiên mã được chứa vùng mã hóa protein của gen và trong một phương án khác phân tử ADN phiên mã được chứa vùng đối nghĩa của gen.

Các gen cần quan tâm về mặt nông học

Phân tử ADN phiên mã được có thể là gen cần quan tâm về mặt nông học. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "gen cần quan tâm về mặt nông học" đề cập đến phân tử ADN phiên mã được mà, khi được biểu hiện trong mô, tế bào hoặc loại tế bào thực vật cụ thể gây ra đặc điểm mong muốn. Sản phẩm gen cần quan tâm về mặt nông học có thể hoạt động trong thực vật để gây ra tác động lên hình thái thực vật, chức năng sinh lý, sự sinh trưởng, phát triển, năng suất, thành phần hạt, protein dinh dưỡng, khả năng kháng sâu hoặc bệnh, và/hoặc khả năng chịu tác động từ môi trường hoặc chất hóa học hoặc có thể có tác dụng làm thuốc trừ sâu trong thức ăn của sâu gây hại trên thực vật này. Theo một phương án của sáng chế, yếu tố điều hòa theo sáng chế được đưa vào cấu trúc sao cho yếu tố điều hòa này được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được mà là gen cần quan tâm về nông học. Ở thực vật chuyển gen chứa cấu trúc này, sự biểu hiện của gen cần quan tâm về mặt nông học có thể gây ra tính trạng nông học có lợi. Tính trạng nông học có lợi có thể bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, khả năng chịu thuốc diệt cỏ, kiểm soát côn trùng, cải biến năng suất, kháng bệnh, kháng mầm bệnh, cải biến sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, cải biến hàm lượng tinh bột, cải biến hàm lượng

dầu, cải biến hàm lượng axit béo, cải biến hàm lượng protein, cải biến sự chín của hoa quả, dinh dưỡng cho người và động vật được tăng cường, sản sinh polyme sinh học, kháng stress môi trường, các peptit làm thuốc, chất lượng xử lý được cải thiện, mùi vị được cải thiện, hữu ích trong việc sản xuất hạt giống lai, sản xuất sợi được cải thiện, và sản sinh nhiên liệu sinh học mong muốn.

Ví dụ về gen cần quan tâm về mặt nông học đã biết trong lĩnh vực này bao gồm các gen cho tính kháng thuốc diệt cỏ (Patent Mỹ số 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876; 6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; và 5,463,175), năng suất tăng (Patent Mỹ số USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; và 5,716,837), kiểm soát côn trùng (Patent Mỹ số 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658; 5,880,275; 5,763,245; và 5,763,241), tính kháng bệnh nấm (Patent Mỹ số 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; và 6,506,962), tính kháng virus (Patent Mỹ số 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; và 5,304,730), tính kháng giun tròn (Patent Mỹ số 6,228,992), tính kháng bệnh do vi khuẩn (Patent Mỹ số 5,516,671), sự sinh trưởng và phát triển của thực vật (Patent Mỹ số 6,723,897 và 6,518,488), sản sinh tinh bột (Patent Mỹ số 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), sản xuất dầu được cải biến (Patent Mỹ số 6,444,876; 6,426,447; và 6,380,462), sản xuất dầu nhiều (Patent Mỹ số 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; và 6,476,295), hàm lượng axit béo được cải biến (Patent Mỹ số 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; và 6,459,018), sản xuất protein nhiều (Patent Mỹ số 6,380,466), làm chín hoa quả (Patent Mỹ số 5,512,466), dinh dưỡng cho người và động vật tăng (Patent Mỹ số 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; và 6,171,640), polyme sinh học (Patent Mỹ số USRE37,543; 6,228,623; và 5,958,745, và 6,946,588), tính kháng stress môi trường (Patent Mỹ số 6,072,103), peptit làm thuốc và peptit tiết ra được (Patent Mỹ số 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; và 6,080,560), các tính trạng xử lý được cải thiện (Patent Mỹ số 6,476,295), khả năng tiêu hóa được cải thiện (Patent Mỹ số 6,531,648) raffinose thấp (Patent Mỹ số 6,166,292), sản xuất enzym công

nghiệp (Patent Mỹ số 5,543,576), mùi vị được cải thiện (Patent Mỹ số 6,011,199), cố định nitơ (Patent Mỹ số 5,229,114), sản xuất hạt giống lai (Patent Mỹ số 5,689,041), sản xuất sợi (Patent Mỹ số 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; và 5,869,720) và sản xuất nhiên liệu sinh học (Patent Mỹ số 5,998,700).

Ngoài ra, gen cần quan tâm về mặt nông học có thể tác động đến các kiểu hình hoặc các đặc điểm thực vật đã đề cập trên đây bằng cách mã hóa phân tử ARN mà gây ra tác dụng điều hòa hướng đích sự biểu hiện gen của gen nội sinh, ví dụ, bằng ARN đối nghĩa (*xem, ví dụ* Patent Mỹ số 5,107,065); ARN ức chế (“ARNi”, bao gồm tác dụng điều hòa sự biểu hiện gen bằng miARN-, siARN-, siARN- hoạt động trans, và các cơ chế qua trung gian sARN được định pha, ví dụ, như được mô tả trong các đơn Mỹ đã được công bố số 2006/0200878 và 2008/0066206, và trong đơn yêu cầu cấp Patent Mỹ số 11/974,469); hoặc các cơ chế qua trung gian đồng ức chế. ARN cũng có thể là phân tử ARN xúc tác (ví dụ, ribozym hoặc công tắc ribo; *xem, ví dụ, đơn Mỹ số 2006/0200878*) được thao tác di truyền để cắt sản phẩm mARN nội sinh mong muốn. Các phương pháp đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo ra và đưa các cấu trúc vào tế bào theo cách sao cho phân tử ADN phiên mã được phiên mã thành phân tử có khả năng gây ra sự bất hoạt gen.

Các gen đánh dấu chọn lọc được

Các gen chuyển đánh dấu chọn lọc được cũng có thể được sử dụng cùng với các yếu tố điều hòa theo sáng chế. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen chuyển đánh dấu chọn lọc được” dùng để chỉ phân tử ADN phiên mã được bất kỳ mà có hoặc không có sự biểu hiện ở thực vật chuyển gen, mô hoặc tế bào, có thể được sàng lọc hoặc được tính điểm theo cách nào đó. Các gen đánh dấu chọn lọc được, và kỹ thuật chọn lọc và sàng lọc liên quan của chúng, để sử dụng trong thực hành theo sáng chế đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phân tử ADN phiên mã được mã hóa β -glucuronidaza (GUS), protein huỳnh quang xanh lá cây (GFP), protein gây ra tính kháng kháng sinh, và các protein gây ra khả năng chịu thuốc diệt cỏ. Ví dụ về gen chuyển đánh dấu chọn lọc được được đưa ra là SEQ ID NO:17.

Biến nạp tế bào

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra các tế bào và thực vật đã biến nạp mà chứa một hoặc nhiều yếu tố điều hòa được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên

mã được.

Thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa phân tử ADN vào vật chủ nhận. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vật chủ" đề cập đến vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật, bao gồm các tế bào, mô, cơ quan, hoặc dòng con bất kỳ của vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật này. Tế bào và mô của thực vật được đặc biệt quan tâm bao gồm tế bào trần, thể sần, rễ, củ, hạt giống, thân, lá, cây giống con, phôi và hạt phấn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được biến nạp” dùng để chỉ tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật mà phân tử ADN ngoại lai, như một cấu trúc, đã được đưa vào đó. Phân tử ADN được đưa vào có thể được tích hợp vào ADN bộ gen của tế bào, mô, cơ quan hoặc sinh vật nhận sao cho phân tử ADN đã đưa vào được kế thừa bởi dòng con tiếp theo. Tế bào hoặc sinh vật "chuyển gen" hoặc "được biến nạp" cũng có thể bao gồm dòng con của tế bào hoặc sinh vật này và dòng con được tạo ra từ chương trình nhân giống sử dụng sinh vật chuyển gen này làm cha mẹ trong phép lai và biểu hiện kiểu hình biến đổi thu được từ sự có mặt của phân tử ADN ngoại lai. Phân tử ADN được đưa vào cũng có thể được đưa tạm thời vào tế bào nhận sao cho phân tử ADN được đưa vào này không được kế thừa bởi dòng con tiếp theo. Thuật ngữ "chuyển gen" đề cập đến vi khuẩn, nấm hoặc thực vật chứa một hoặc nhiều phân tử ADN khác loại.

Có nhiều phương pháp đã được biết rõ đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này để đưa các phân tử ADN vào các tế bào thực vật. Quy trình này thường bao gồm các bước chọn tế bào chủ thích hợp, biến nạp tế bào chủ bằng vector, và thu được tế bào chủ đã biến nạp. Các phương pháp và nguyên liệu để biến nạp tế bào thực vật bằng cách đưa cấu trúc thực vật vào bộ gen thực vật trong thực hành theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trong số các phương pháp đã được biết rõ và đã được chứng minh. Các phương pháp thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở phương pháp gây nhiễm vi khuẩn (ví dụ, *Agrobacterium*), các vector nhị thể BAC, phân phối trực tiếp ADN (ví dụ, bằng cách biến nạp qua trung gian PEG, hấp thu ADN gây ra bởi sự khử nước/ức chế, phương pháp xung điện, phương pháp khuấy với các sợi silicon cacbua, và phương pháp tăng tốc các hạt được bọc ADN), biên tập gen (ví dụ, các hệ CRISPR-Cas), trong số các phương pháp khác.

Các tế bào chủ có thể là tế bào hoặc sinh vật bất kỳ, như tế bào thực vật, tế bào tảo, tế bào nấm, nấm, tế bào vi khuẩn, hoặc tế bào côn trùng. Trong các phương án cụ thể, các tế bào chủ và các tế bào đã được biến nạp có thể bao gồm các tế bào từ các

cây trồng.

Sau đó thực vật chuyển gen có thể được tái tạo từ tế bào thực vật chuyển gen theo sáng chế. Bằng cách sử dụng kỹ thuật nhân giống thông thường hoặc phương pháp tự thụ phấn, hạt giống có thể được tạo ra từ thực vật chuyển gen này. Hạt giống này, và cây con thu được được trồng từ hạt giống này, sẽ chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế, và do đó sẽ là chuyển gen.

Thực vật chuyển gen theo sáng chế có thể được tự thụ phấn để tạo ra hạt giống cho các thực vật chuyển gen đồng hợp tử theo sáng chế (đồng hợp tử đối với phân tử ADN tái tổ hợp) hoặc được lai với các thực vật không chuyển gen hoặc các thực vật chuyển gen khác để tạo ra hạt giống cho các thực vật chuyển gen dị hợp tử theo sáng chế (dị hợp tử đối với phân tử ADN tái tổ hợp). Cả thực vật chuyển gen đồng hợp tử và dị hợp tử này được gọi ở đây là “các cây con”. Các cây con là các thực vật chuyển gen có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen gốc và chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các hạt giống được tạo ra bằng cách sử dụng thực vật chuyển gen theo sáng chế có thể được thu hoạch và được sử dụng để trồng các thế hệ thực vật chuyển gen, nghĩa là các cây con theo sáng chế, chứa cấu trúc theo sáng chế và biểu hiện gen cần quan tâm về mặt nông học. Mô tả về các phương pháp nhân giống được sử dụng phổ biến cho các cây trồng khác nhau có thể được tìm thấy trong một số sách tham khảo, xem, ví dụ, Allard, *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98 (1960); Simmonds, *Principles of Crop Improvement*, Longman, Inc., NY, 369-399 (1979); Sneep và Hendriksen, *Plant breeding Perspectives*, Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation (1979); Fehr, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, Xuất bản lần 2, Monograph, 16:249 (1987); Fehr, *Principles of Variety Development, Theory and Technique*, (Vol. 1) và *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376 (1987).

Các thực vật biến nạp có thể được phân tích về sự có mặt của một gen hoặc nhiều gen cần quan tâm và mức độ biểu hiện và/hoặc protein được gây ra bởi các yếu tố điều hòa theo sáng chế. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này đã biết nhiều phương pháp sẵn có để phân tích các thực vật được biến nạp. Ví dụ, phương pháp để phân tích thực vật bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp thẩm tách Nam hoặc phương pháp thẩm tách Bắc, phương pháp dựa trên PCR, các phân tích hóa sinh, các phương pháp sàng lọc kiểu hình, các đánh giá đồng ruộng, và các thử nghiệm chẩn đoán miễn

dịch. Sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được có thể được đo bằng cách sử dụng các chất phản ứng TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) và các phương pháp như được mô tả bởi nhà sản xuất và số lần chu kỳ PCR được xác định bằng cách sử dụng Ma trận kiểm tra TaqMan®. Ngoài ra, chất phản ứng Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) và các phương pháp như được mô tả bởi nhà sản xuất có thể được sử dụng để đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển.

Sáng chế cũng đề xuất các bộ phận của thực vật theo sáng chế. Các bộ phận của thực vật bao gồm, nhưng không giới hạn ở, lá, thân, rễ, củ, hạt giống, nội nhũ, nõn và hạt phấn. Các bộ phận thực vật theo sáng chế có thể còn sống, không còn sống, có thể tái tạo, và/hoặc không thể tái tạo. Sáng chế cũng bao gồm và đề xuất các tế bào thực vật đã biến nạp chứa phân tử ADN theo sáng chế. Các tế bào thực vật đã biến nạp hoặc chuyển gen theo sáng chế bao gồm các tế bào thực vật có thể tái tạo và/hoặc không thể tái tạo.

Sáng chế cũng đề xuất thương phẩm mà được sản xuất từ thực vật chuyển gen hoặc một bộ phận của chúng chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Thương phẩm theo sáng chế chứa lượng phát hiện được của ADN chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO: 1-15. Như được sử dụng ở đây, “thương phẩm” đề cập đến chế phẩm hoặc sản phẩm bất kỳ chứa nguyên liệu thu được từ thực vật, hạt giống, tế bào thực vật, hoặc bộ phận thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các thương phẩm bao gồm nhưng không giới hạn ở hạt giống, hạt, các bộ phận của thực vật, và bột đã xử lý. Thương phẩm theo sáng chế sẽ chứa lượng phát hiện được của ADN tương ứng với phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Phương pháp phát hiện một hoặc nhiều ADN này trong mẫu có thể được sử dụng để xác định hàm lượng hoặc nguồn gốc thương phẩm. Phương pháp chuẩn bất kỳ để phát hiện các phân tử ADN có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp phát hiện được mô tả ở đây.

Sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn nhờ việc tham khảo các ví dụ sau đây, các ví dụ này được cung cấp nhằm mục đích minh họa, và không được dự định làm giới hạn sáng chế, trừ khi được chỉ ra cụ thể. Nên được hiểu bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này là các kỹ thuật được mô tả trong các ví dụ sau đây là các kỹ thuật được phát hiện bởi tác giả sáng chế là hữu ích trong thực hành theo sáng chế. Tuy nhiên, người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này, qua phần mô tả này, nên hiểu rõ là nhiều thay đổi có thể được tạo ra trong các phương án cụ thể đã được mô tả và vẫn thu được kết quả giống hệt hoặc tương tự mà không vượt ra khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế, do đó

tất cả các vấn đề trên đây hoặc được thể hiện trong các hình vẽ kèm theo cần được hiểu là có ý nghĩa minh họa và không có ý nghĩa làm giới hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Nhận diện và tách dòng các yếu tố điều hòa

Các yếu tố điều hòa phiên mã mới và các nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa (EXP) được nhận diện và tách dòng từ ADN bộ gen của loài hai lá mầm *Cucumis melo* (WSH-39-1070AN) và *Medicago truncatula*.

Các yếu tố điều hòa phiên mã được lựa chọn dựa vào số liệu gen chip (microarray) thuộc sở hữu độc quyền và cộng đồng thu được từ các thử nghiệm lập profin phiên mã được thực hiện ở đậu tương (*Glycine max*) và *Arabidopsis*, cũng như các nghiên cứu dựa trên sự tương đồng bằng cách sử dụng các trình tự hai lá mầm đã biết làm truy vấn trên các trình tự *Cucumis melo* độc quyền và các trình tự *Medicago truncatula* thuộc sở hữu độc quyền và cộng đồng.

Bằng cách sử dụng các trình tự đã được nhận diện, phân tích tin sinh học được thực hiện để nhận diện các yếu tố điều hòa nằm trong ADN đã khuếch đại. Ví dụ, phân tích tin sinh học được thực hiện để nhận diện vị trí khởi đầu phiên mã (TSS) và tính hai chiều, các intron, hoặc trình tự mã hóa ngược dòng bất kỳ có mặt trong trình tự này. Bằng cách sử dụng các kết quả của phân tích này, các yếu tố điều hòa được xác định nằm trong các trình tự ADN và các đoạn nối được thiết kế để khuếch đại các yếu tố điều hòa này. Phân tử ADN tương ứng cho mỗi yếu tố điều hòa được khuếch đại bằng cách sử dụng các điều kiện phản ứng chuỗi polymeraza chuẩn với các đoạn nối chứa các vị trí enzym giới hạn duy nhất và ADN bộ gen được phân lập từ *Cucumis melo* và *Medicago truncatula*. Các đoạn ADN tạo thành được nối vào các vector biểu hiện thực vật cơ sở bằng cách sử dụng kỹ thuật tiêu hóa bằng enzym giới hạn chuẩn các vị trí giới hạn thích hợp và các phương pháp nối ADN.

Phân tích yếu tố điều hòa TSS và các mối nối ở vị trí cắt nối intron/exon có thể được thực hiện bằng cách sử dụng mô thực vật đã biến nạp. Tóm lại, các thực vật được biến nạp bằng vector biểu hiện thực vật chứa các đoạn ADN đã tách dòng được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được khác loại. Tiếp theo, hệ thống 5' RACE để khuếch đại nhanh các đầu cùng cADN, phiên bản 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) được sử dụng để xác nhận yếu tố điều hòa TSS và các mối nối ở vị trí cắt nối

intron/exon bằng cách phân tích trình tự ADN của các sản phẩm phiên mã mRNA tạo thành.

Các trình tự ADN mã hóa các nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã *Cucumis* và *Medicago* hoặc các trình tự EXP mà chứa yếu tố khởi động, được liên kết chức năng với yếu tố dẫn đầu được trình bày trong Bảng 1 cùng với trình tự dẫn đầu và trình tự khởi động tương ứng của chúng.

Bảng 1. Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã, các trình tự khởi động, các trình tự dẫn đầu và các intron được phân lập từ *Cucumis melo* và *Medicago truncatula*

Mô tả	SEQ ID NO:	Chú thích gen
EXP-CUCme.Fe2:1	1	Protein Ferredoxin 2 (Fe2) giả định
P-CUCme.Fe2:1	2	Protein Ferredoxin 2 (Fe2) giả định
L-CUCme.Fe2:1	3	Protein Ferredoxin 2 (Fe2) giả định
EXP-CUCme.CipLhcb:1	4	Protein liên kết chất diệp lục a-b 13
P-CUCme.CipLhcb:1	5	Protein liên kết chất diệp lục a-b 13
L-CUCme.CipLhcb:1	6	Protein liên kết chất diệp lục a-b 13
EXP-CUCme.Bbz:1	7	Tương tự protein ngón tay kẽm hộp B 24
P-CUCme.Bbz:1	8	Tương tự protein ngón tay kẽm hộp B 24
L-CUCme.Bbz:1	9	Tương tự protein ngón tay kẽm hộp B 24
EXP-Mt.Lhcb2-1:1	10	Protein phức hợp thu ánh sáng b2
P-Mt.Lhcb2-1:2:1	11	Protein phức hợp thu ánh sáng b2
L-Mt.Lhcb2-1:2:1	12	Protein phức hợp thu ánh sáng b2
EXP-Mt.PSII-T:1:1	13	Tiền chất lục lạp hệ quang hóa II
P-Mt.PSII-T-1:2:1	14	Tiền chất lục lạp hệ quang hóa II
L-Mt.PSII-T-1:2:1	15	Tiền chất lục lạp hệ quang hóa II

Ví dụ 2

Phân tích các yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện GUS ở các cây đậu tương được biến nạp ổn định

Các cây đậu tương được biến nạp bằng các vector, cụ thể là các vector biểu hiện ở thực vật, chứa yếu tố điều hòa thử nghiệm điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β-

glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS, để đánh giá tác động của các yếu tố điều hòa đã chọn trên sự biểu hiện.

Các cây đậu tương được biến nạp bằng các cấu trúc biểu hiện GUS thực vật được liệt kê trong Bảng 2. Các yếu tố điều hòa được tách dòng vào vector biểu hiện thực vật cơ sở bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này. Các vector biểu hiện thực vật thu được chứa vùng biên phải từ *Agrobacterium tumefaciens* (biên phải B-AGRtu.), caxet lựa chọn gen chuyển thứ nhất được sử dụng để chọn các tế bào thực vật đã biến nạp mà gây ra sự kháng glyphosate diệt cỏ hoặc kháng sinh, spectinomycin; caxet gen chuyển thứ hai để đánh giá hoạt tính của yếu tố điều hòa, mà chứa trình tự EXP được liên kết chức năng 5' với trình tự mã hóa cho β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO: 17) chứa intron có thể xử lý được thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng được bằng ánh sáng ở khoai tây (số truy cập ngân hàng gen: X04753), được liên kết chức năng 5' với vùng kết thúc 3' từ gen *Gossypium barbadense* E6 (T-Gb.E6-3b:3b:1, SEQ ID NO: 18); và vùng biên trái từ *Agrobacterium tumefaciens* (biên trái B-AGRtu.).

Bảng 2. Các yếu tố điều hòa và các cấu trúc plasmit biểu hiện GUS tương ứng

Các cấu trúc	Mô tả EXP	SEQ ID NO:
pMON142244	EXP-CUCme.Fe2:1	1
pMON142241	EXP-CUCme.CipLhcb:1	4
pMON142216	EXP-CUCme.Bbz:1	7
pMON116798	EXP-Mt.Lhcb2:1:1	10
pMON116792	EXP-Mt.PSII-T:1:1	13

Các tế bào cây đậu tương được biến nạp bằng cách sử dụng các cấu trúc vector biến nạp nhị thể được mô tả trên đây bằng cách biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào thực vật đã biến nạp thu được được cảm ứng để tạo ra cây đậu tương đầy đủ.

Phân tích GUS mô hóa học được sử dụng cho phân tích định tính và định lượng sự biểu hiện của các cây đã biến nạp. Các phần mô nguyên vẹn được ủ với dung dịch nhuộm GUS X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-b-glucuronit) (1 milligam/millilit) trong khoảng thời gian thích hợp, rửa, và kiểm tra bằng mắt thường sự tạo màu xanh lam. Hoạt tính

GUS được xác định định tính bằng cách kiểm tra trực tiếp bằng mắt thường hoặc kiểm tra dưới kính hiển vi bằng cách sử dụng các cơ quan và mô thực vật đã chọn.

Để phân tích định lượng sự biểu hiện GUS, toàn bộ protein được chiết từ các mô đã chọn của các cây đậu tương đã biến nạp. Một microgam trên tổng lượng protein được sử dụng với cơ chất tạo huỳnh quang 4-metyleumbelliferyl- β -D-glucuronit (MUG) trong tổng thể tích phản ứng là 50 microlit. Sản phẩm phản ứng, 4-metlyumbelliferone (4-MU), phát huỳnh quang tối đa ở độ pH cao, trong đó nhóm hydroxyl được ion hóa. Việc bổ sung dung dịch bazơ là natri cacbonat làm dừng thử nghiệm này và đồng thời điều chỉnh độ pH để định lượng sản phẩm huỳnh quang này. Huỳnh quang được đo với bước sóng kích thích là 365 nm, bước sóng phát là 445 nm sử dụng Fluoromax-3 với máy đọc Micromax Reader, có độ rộng khe kích thích được đặt là 2 nm và khe phát xạ được đặt là 3nm. Các giá trị được cung cấp ở đơn vị là nmol GUS/giờ/mg tổng lượng protein.

Các mô sau đây được lấy mẫu để biểu hiện GUS ở thể hệ R₀; lá bẻ (sink) lá nguồn (source), và rễ giai đoạn Vn5; cuống lá, lá nguồn, hoa và lá mầm giai đoạn R1; quả đậu và hạt giống chưa trưởng thành giai đoạn R3; và phôi và lá mầm giai đoạn quả vàng. Bảng 3 và 4 dưới đây thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình cho mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 3. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương được biến nạp ổn định được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa thu được từ *Cucumis melo*

Giai đoạn	Cơ quan	EXP- CUCme.Fe2:1	EXP- CUCme.CipLhcb:1	EXP- CUCme.Bbz:1
Vn5	Lá bẻ	391	159	100
Vn5	Rễ	40	35	24
Vn5	Lá nguồn	431	120	185
R1	Cuống lá	581	724	32
R1	Lá nguồn	600	357	41
R1	Hoa	290	111	30
R5	Lá mầm	38	31	13
R3	Quả đậu	778	1199	85
R3	Hạt giống chưa trưởng	52	56	47

	thành			
Quả đậu vàng	Phôi	23	28	38
Quả đậu vàng	Lá mầm	33	35	49

Bảng 4. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương được biến nạp ổn định được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa thu được từ *Medicago truncatula*

Giai đoạn	Cơ quan	EXP- Mt.Lhcb2:1:1	EXP-Mt.PSII- T:1:1
Vn5	Lá bẻ	108	22
Vn5	Rễ	21	11
Vn5	Lá nguồn	148	42
R1	Cuống lá	153	83
R1	Lá nguồn	94	118
R1	Hoa	39	21
R5	Lá mầm	13	9
R3	Quả đậu	85	33
R3	Hạt giống chưa trưởng thành	5	9
Quả đậu vàng	Phôi	4	0
Quả đậu vàng	Lá mầm	4	0

Như có thể thấy trong các Bảng 3 và 4, mỗi yếu tố điều hòa có kiểu biểu hiện riêng trong các mô được lấy mẫu. Cả EXP-CUCme.Fe2:1 (SEQ ID NO: 1) và EXP-CUCme.CipLhcb:1 (SEQ ID NO: 4) đều biểu hiện cao trong quả đậu R3 và thể hiện mức biểu hiện thấp nhất ở hạt giống chưa trưởng thành R3, rễ Vn5, lá mầm R5, và phôi và lá

mầm giai đoạn quả vàng. Sự biểu hiện GUS được điều khiển bởi EXP-CUCme.Fe2:1 cũng là cao ở lá bẻ và lá nguồn giai đoạn Vn5 và cuống lá, lá nguồn và hoa giai đoạn R1. Yếu tố điều hòa EXP-CUCme.Bbz:1 (SEQ ID NO: 7) thể hiện sự biểu hiện cao nhất ở lá nguồn và lá bẻ giai đoạn Vn5 và quả đậu giai đoạn R3. Sự biểu hiện GUS được điều khiển bởi EXP-Mt.Lhcb2:1:1 (SEQ ID NO: 10) là cao nhất ở lá nguồn giai đoạn Vn5 và cuống lá R1. EXP-Mt.PSII-T:1:1 (SEQ ID NO: 13) thể hiện mức biểu hiện cao nhất ở lá nguồn giai đoạn R1.

Mỗi yếu tố điều hòa tạo ra kiểu biểu hiện riêng mà có thể được sử dụng để điều khiển một cách tối ưu sự biểu hiện của các gen chuyển khác nhau, tùy theo sự ưu tiên mong muốn để biểu hiện.

Ví dụ 3

Các yếu tố tăng cường thu được từ các yếu tố điều hòa

Các yếu tố tăng cường thu được từ các yếu tố khởi động được trình bày bằng các SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14. Các yếu tố tăng cường có thể chứa một hoặc nhiều yếu tố điều hòa *cis* mà khi được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với yếu tố khởi động, hoặc được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng cường bổ sung mà được liên kết chức năng với trình tự khởi động, có thể làm tăng hoặc điều biến mức độ biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được, hoặc tạo ra sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được ở một loại tế bào cụ thể hoặc cơ quan của thực vật hoặc ở một thời điểm cụ thể trong quá trình phát triển hoặc theo nhịp sinh học ngày đêm. Các yếu tố tăng cường được tạo ra bằng cách loại bỏ hộp TATA hoặc các yếu tố tương tự về mặt chức năng và trình tự xuôi dòng bất kỳ từ các trình tự khởi động mà cho phép khởi động sự phiên mã từ trình tự khởi động, ví dụ các trình tự được trình bày bằng các SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14 hoặc các đoạn của chúng.

Hộp TATA trong các trình tự khởi động thực vật không được bảo tồn cao như trong một số sinh vật nhân chuẩn khác. Do đó, để xác định một đoạn là yếu tố tăng cường, trước hết phải nhận diện vị trí khởi động phiên mã (TSS) của gen đó, trong đó 5' UTR được phiên mã đầu tiên. Ví dụ, yếu tố điều hòa phiên mã, EXP-Mt.Lhcb2:1:1 (SEQ ID NO: 10) chứa yếu tố khởi động, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11), được liên kết chức năng với 5' UTR hoặc yếu tố dẫn đầu, L-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 12). Trong yếu tố khởi động 1837 bp, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11), yếu tố tương tự TATA lõi giả định được tìm thấy trong các nucleotit từ 1798 đến 1803. Đoạn tăng cường thu

được từ P-Mt.Lhcb2-1:2:1 có thể chứa các nucleotit từ 1 đến 1797 của SEQ ID NO: 11, tạo ra trình tự được thể hiện bằng SEQ ID NO: 16 (E-Mt.Lhcb2). Các yếu tố tăng cường thu được từ trình tự khởi động, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11) có thể chứa thêm các đoạn nhỏ hơn của E-Mt.Lhcb2 (SEQ ID NO: 16). Hiệu quả của các yếu tố tăng cường thu được từ trình tự khởi động, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11) được xác định theo kinh nghiệm bằng cách tạo ra yếu tố điều hòa phiên mã khả năng chứa yếu tố tăng cường thu được từ trình tự khởi động, P-Mt.Lhcb2-1:2:1 (SEQ ID NO: 11), mà được liên kết chức năng với trình tự khởi động và trình tự dẫn đầu và được sử dụng để điều khiển sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được như GUS trong thử nghiệm thực vật ổn định hoặc tạm thời.

Việc tinh chế thêm yếu tố tăng cường có thể là cần thiết và được xác nhận bằng kinh nghiệm. Ngoài ra, vị trí của yếu tố tăng cường so với các yếu tố khác nằm trong yếu tố điều hòa phiên mã khả năng cũng được xác định bằng kinh nghiệm, vì thứ tự của mỗi yếu tố bên trong yếu tố điều hòa phiên mã khả năng có thể gây ra các tác động khác nhau, tùy theo các vị trí tương đối của mỗi yếu tố. Một số yếu tố khởi động sẽ có nhiều hộp TATA hoặc yếu tố tương tự hộp TATA và có thể có nhiều vị trí khởi động phiên mã. Trong các trường hợp này, có thể là cần thiết phải nhận diện trước vị trí mà TSS thứ nhất được đặt và sau đó bắt đầu thiết kế các yếu tố tăng cường sử dụng TSS thứ nhất để ngăn cản sự khởi động quá trình phiên mã có thể xảy ra trong yếu tố tăng cường giả định.

Các yếu tố tăng cường, thu được từ yếu tố khởi động được thể hiện bằng SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, và 14 được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với yếu tố khởi động, hoặc được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng cường bổ sung mà được liên kết chức năng với trình tự khởi động. Ngoài ra, các yếu tố tăng cường có thể được tách dòng, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, để tạo ra yếu tố tăng cường lớn hơn chứa hai hoặc nhiều bản sao của yếu tố tăng cường này và được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với yếu tố khởi động, hoặc được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với yếu tố tăng cường bổ sung mà được liên kết chức năng với trình tự khởi động tạo ra yếu tố điều hòa phiên mã khả năng. Các yếu tố tăng cường cũng có thể được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để được liên kết chức năng 5' với yếu tố khởi động thu được từ sinh vật thuộc giống khác, hoặc được liên kết chức năng 5'

hoặc 3' với yếu tố tăng cường bổ sung thu được từ các sinh vật thuộc chi khác mà được liên kết chức năng với trình tự khởi động thu được từ sinh vật thuộc cùng một chi hoặc khác chi, tạo ra yếu tố điều hòa phiên mã khảm. Vectơ biến nạp biểu hiện GUS ở thực vật có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này tương tự với các cấu trúc đã mô tả trong Ví dụ 2 trên đây trong đó vectơ biểu hiện thực vật thu được chứa vùng biên phải từ *Agrobacterium tumefaciens* (vùng biên phải B-AGRtu.), casset chọn lọc gen chuyển thứ nhất được sử dụng để lựa chọn các tế bào thực vật đã biến nạp gây ra tính kháng kháng sinh, spectinomycin; và casset gen chuyển thứ hai để kiểm tra yếu tố tăng cường chứa, yếu tố tăng cường được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với yếu tố khởi động hoặc được liên kết chức năng 5' hoặc 3' với yếu tố tăng cường bổ sung mà lại được liên kết chức năng với trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với yếu tố dẫn đầu, được liên kết chức năng với trình tự mã hóa cho β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO: 17) chứa intron có thể xử lý được thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng được bằng ánh sáng ở khoai tây (số truy cập ngân hàng gen: X04753), được liên kết chức năng với vùng kết thúc 3' từ gen *Gossypium barbadense* E6 (T-Gb.E6-3b:3b:1, SEQ ID NO: 18), và vùng biên trái từ *A. tumefaciens* (biên trái B-AGRtu.). Các plasmit thu được được sử dụng để biến nạp cây đậu tương hoặc cây thuộc chi khác bằng các phương pháp được mô tả trên đây. Ngoài ra, các tế bào trần thu được từ đậu tương hoặc cây thuộc chi khác được biến nạp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để thực hiện các thử nghiệm tạm thời

Sự biểu hiện GUS được điều khiển bởi yếu tố điều hòa chứa một hoặc nhiều yếu tố tăng cường được đánh giá trong các thử nghiệm thực vật ổn định hoặc tạm thời để xác định tác động của yếu tố tăng cường này trên sự biểu hiện của phân tử ADN phiên mã được. Các biến đổi với một hoặc nhiều yếu tố tăng cường hoặc sự nhân đôi một hoặc nhiều yếu tố tăng cường có thể được thực hiện dựa vào thử nghiệm theo kinh nghiệm và tác dụng điều hòa sự biểu hiện gen thu được được quan sát thấy bằng cách sử dụng mỗi chế phẩm yếu tố điều hòa. Sự thay đổi vị trí tương đối của một hoặc nhiều yếu tố tăng cường trong các yếu tố điều hòa hoặc yếu tố điều hòa khảm thu được có thể tác động đến hoạt tính phiên mã hoặc tính đặc hiệu của yếu tố điều hòa hoặc yếu tố điều hòa khảm và được xác định theo kinh nghiệm để phát hiện yếu tố tăng cường tốt nhất cho profin biểu hiện gen chuyển mong muốn ở cây ngô hoặc cây thuộc chi khác.

Sáng chế mô tả và minh họa các nguyên tắc theo sáng chế, người có trình độ trung

bình trong lĩnh vực này nên hiểu rõ là sáng chế có thể được biến đổi về bố cục và chi tiết mà không vượt ra khỏi các nguyên tắc này. Tác giả sáng chế yêu cầu bảo hộ tất cả các biến đổi nằm trong tinh thần và phạm vi của yêu cầu bảo hộ. Tất cả các công bố và tài liệu patent đã công bố được trích dẫn ở đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn ở mức độ giống như thể từng công bố hoặc đơn yêu cầu cấp patent được chỉ ra cụ thể và riêng biệt này được đưa vào bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) polynucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95 phần trăm với SEQ ID NO: 5, trong đó polynucleotit này có hoạt tính trình tự khởi động;
 - b) polynucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 97 phần trăm với SEQ ID NO: 4, trong đó polynucleotit này có hoạt tính điều hòa gen;
 - c) polynucleotit bao gồm SEQ ID NO: 4 hoặc 5; và
 - d) một đoạn bao gồm ít nhất 150 nucleotit liên tục của SEQ ID NO: 5, trong đó đoạn này có hoạt tính trình tự khởi động;
 trong đó phân tử ADN này được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được khác loại.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó polynucleotit được nêu có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 97 phần trăm với SEQ ID NO: 5.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó polynucleotit được nêu có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 99 phần trăm với SEQ ID NO: 4 hoặc 5.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 3, trong đó polynucleotit được nêu chứa trình tự ADN của SEQ ID NO: 4 hoặc 5.
5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN phiên mã được khác loại chứa gen cần quan tâm về mặt nông học.
6. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó gen cần quan tâm về mặt nông học gây ra khả năng chịu thuốc diệt cỏ ở thực vật.
7. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó gen cần quan tâm về mặt nông học gây ra tính kháng sâu bệnh ở thực vật.
8. Tế bào thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm:
 - a) polynucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95 phần trăm với SEQ ID NO: 5, trong đó polynucleotit này có hoạt tính trình tự khởi động;
 - b) polynucleotit có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 97 phần trăm với SEQ ID NO:

4, trong đó polynucleotit này có hoạt tính điều hòa gen;

c) polynucleotit bao gồm SEQ ID NO: 4 hoặc 5; và

d) một đoạn bao gồm ít nhất 150 nucleotit liên tục của SEQ ID NO: 5, trong đó đoạn này có hoạt tính trình tự khởi động;

trong đó phân tử ADN này được liên kết chức năng với phân tử ADN phiên mã được khác loại.

9. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 8, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này là tế bào thực vật một lá mầm.

10. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 8, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này là tế bào thực vật hai lá mầm.

11. Thực vật chuyển gen, hoặc bộ phận của nó, chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.

12. Cây con của thực vật chuyển gen theo điểm 11, hoặc một bộ phận của nó, trong đó cây con này hoặc bộ phận của nó chứa phân tử ADN tái tổ hợp được nêu.

13. Hạt giống chuyển gen, trong đó hạt giống này chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.

14. Quy trình sản xuất thương phẩm bao gồm bước thu thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của nó theo điểm 11 và sản xuất thương phẩm từ đó.

15. Quy trình theo điểm 14, trong đó thương phẩm này là dịch cô đặc protein, thể phân lập protein, hạt, tinh bột, hạt giống, bột thô, bột, sinh khối, hoặc dầu hạt.

16. Quy trình biểu hiện phân tử ADN phiên mã được bao gồm bước thu thực vật chuyển gen theo điểm 11 và trồng thực vật này, trong đó ADN phiên mã được được biểu hiện.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP VÀ THỰC VẬT VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP NÀY

<130> MONS:417WO

<150> US 62/306790

<151> 11-03-2016

<160> 18

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 2001

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(2001)

<223> Trình tự EXP thu được từ gen protein Ferredoxin giả định 2 của Cucumis melo chứa trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

<400> 1

ttgtttgttt ctttatagta gatgatgttt tcaaatatag aaaatgagct aatgtttctt 60

ttaaatatag taaaatttta ctttctatcc atgaaaaact gtgatagatt ccaaatagtc 120

aactattact ttagtgatcg atagaaagta attcttcatt cttattgcat tctttgttat	180
ggttccttgg gtgcaatfff atccaacaag ttccaaatct tcaaagaaaa gatttttttt	240
ttaatttata actatfffita gggccagtgt caatttataa atctaaattt taagttatat	300
caattcaaac tttgaactff aattatctgg ataatgagta cattctcgat gcagaggata	360
atgaaaggat caactffcca tactctatca tgtaaagcat gagcatgttc ttgtgtacga	420
aaattaaaat caatataaga taatttagta aataaagacg acttaaatfa tcattftaat	480
atatcaatag tttcactctc actffacaat tgcagaattc aaaataataa taataaaaaa	540
gaaattftaa gagacaacgt gagtctaaat ctaacttatt atcgatatac attffcatca	600
acatatgtta aagactaaaa attcaatgat tcgaattfff gtcggtccta tcctactaaa	660
gaaacctcat gtgtcaattc actcaaatct gaaaagattc atccattfta actcctctct	720
atccattact aaccaaagca aaaattcaat gagagcagat tgaagttftc acccttgtct	780
taagaagaat gtctacacaa tgtcctaatt tftaatgtag tgcgtfffta ttagttacaa	840
acaattftagt gggatccact catcatataa atgaaaaaaa gaaaatactc atacaaattc	900
atcgftatga cacaagtagc cacccataga caatattctc tftatgaatt agttattgtt	960
tgatcattta gtttccgaaa cttatatfff gagcaattga gatttgaatt taggtftgat	1020
ttaattcctt taagttftga aagtgatatt taattctftc gagttftaag atgaattftc	1080

aaatagtttc tagataagtc tacaactagc taatataaca aaatggcgac gtgatagtta	1140
gatatgttat ttagactttt ttaaactgct aattcaaatt gataagaaag ttagaccgca	1200
aggattttat agtacaatag gattggagga atttgaatca caagctcaa agtcacatta	1260
gcacatcctt aatgttagct gaactacttt tgcaaaaatg aaaactcgat tatgaaaaaa	1320
aagttcaaat cttgtgtact tgtgtaatgt cctaagttta ggtggggcca tgaatgaatt	1380
aggatcatga cttttgattg aaatagatct aagaacatga aagtataatt aagaaaaact	1440
taaaagaatc aaattttact acatatacca acaatgtgca ttttcctctt gaatgactca	1500
atcatagaaa ctaaaaagca tgcggtgtta gtttgtggta ccaataactt ttactcttag	1560
aagcaatcta agacgaaca ggatggcatt gttaaatacat agggataaag aggaatgttg	1620
agaccattag agatcgaatc tagattcaa accctactaa atacttgagc ttgggcatta	1680
catctagaga ccagaagtgt attttgttta tttattatta ttttatttga aaaaaaag	1740
aacaaaatgg tttatgaagc cattagtact ttaagcggct gttgttcata ttttgaaacc	1800
aatcctttgg aaggataaga acccacaacc attaccattc attgccaaga taaggcctta	1860
actcacaacc acacgctctc tatttcactc tgcacgttat agccacacga cccaaatac	1920
ctctttaaaa aaccctcttc actctctcaa ttccatttca tctcatctca tctccaatcc	1980
aacacaaaaa caagaagaaa a	2001

<210> 2

<211> 1936

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(1936)

<223> Trình tự khởi động thu được từ gen protein Ferredoxin giả định 2 của Cucumis melo.

<400> 2

ttgtttgttt ctttatagta gatgatgttt tcaaatatag aaaatgagct aatgtttctt	60
ttaaatatag taaaatttta ctttctatcc atgaaaaact gtgatagatt ccaaatagtc	120
aactattact ttagtgatcg atagaaagta attcttcatt cttattgcat tctttgttat	180
ggttccttgg gtgcaatttt atccaacaag ttccaaatct tcaaagaaa gatttttttt	240
ttaatttata actattttta gggccagtgt caatttataa atctaaattt taagttatat	300
caattcaaac tttgaacttt aattatctgg ataatgagta cattctcgat gcagaggata	360
atgaaaggat caactttcca tactctatca tgtaaagcat gagcatgttc ttgtgtacga	420
aaattaaaat caatataaga taatttagta aataaagacg acttaaatta tcattttaa	480
atatcaatag tttcactctc actttacaat tgcagaattc aaaataataa taataaaaaa	540

gaaatttaaa gagacaacgt gagtctaaat ctaacttatt atcgatatac attttcatca	600
acatatgtta aagactaaaa attcaatgat tcgaattttt gctcgtccta tcctactaaa	660
gaaacctcat gtgtcaattc actcaaactc gaaaagattc atccatttca actcctctct	720
atccattact aaccaaagca aaaattcaat gagagcagat tgaagtttcc acccttgtct	780
taagaagaat gtctacacaa tgtcctaatt tttaatgtag tgcgttttta ttagttacaa	840
acaatttagt gggatccact catcatataa atgaaaaaaaa gaaaatactc atacaaattc	900
atcgttatga cacaagtagc cacccataga caatattctc tttatgaatt agttattgtt	960
tgatcattta gtttccgaaa cttatatatt gagcaattga gatttgaatt taggtttgat	1020
ttaattcctt taagttttga aagtgatatt taattctttc gagttttaag atgaatttct	1080
aaatagtttc tagataagtc tacaactagc taatataaca aaatggcgac gtgatagtta	1140
gatatgttat ttagactttt ttaaactgct aattcaaatt gataagaaag ttagaccgca	1200
aggattttat agtacaatag gattggagga atttgaatca caagctccaa agtcacatta	1260
gcacatcctt aatgttagct gaactacttt tgcaaaaatg aaaactcgat tatgaaaaaa	1320
aagttcaaatt cttgtgtact tgtgtaatgt cctaagttta ggtggggcca tgaatgaatt	1380
aggatcatga cttttgattg aaatagatct aagaacatga aagtataatt aagaaaaact	1440
taaaagaatc aaattttact acatatacca acaatgtgca ttttcctctt gaatgactca	1500

atcatagaaa ctaaaaagca tgcggtgtta gtttgtggta ccaataactt ttactcttag 1560

aagcaatcta agacgaacaa ggatggcatt gttaaactcat agggataaag aggaatgttg 1620

agaccattag agatcgaatc tagattccaa accctactaa atacttgagc ttgggcatta 1680

catctagaga ccagaagtgt attttgttta tttattatta ttttatttga aaaaaaaagg 1740

aacaaaatgg tttatgaagc cattagtact ttaagcggct gttgttcata ttttgaaacc 1800

aaatctttgg aaggataaga acccacaacc attaccattc attgccaaga taaggcctta 1860

actcacaacc acacgtcttc tatttcactc tgcacgttat agccacacga cccaaatatc 1920

ctctttaaaa aaccct 1936

<210> 3

<211> 65

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(65)

<223> Trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein Ferredoxin giả định 2 của Cucumis melo.

<400> 3

cttcactctc tcaattccat ttcattctcat ctcatctcca atccaacaca aaaacaagaa 60

gaaaa

65

<210> 4

<211> 2001

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(2001)

<223> Trình tự EXP thu được từ gen protein liên kết chất diệt lục a-b 13 của Cucumis melo chứa trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

<400> 4

aaaacccaaa taaatacaaa gttaatagat tttcaacaat gcggggatag ctcagttggg 60

agagcgtcag actgaagatc tgaaggctgc gtgttcgatc cacgctcacc gcattctttt 120

tttgttctgt ttttcccagc gaatgaacta tccatacgtc gtcgtttgta tagccatgat 180

ccatgaagcg ctctaattac caatcathtt ttctttcttg gaattgatca agttacaaat 240

ataaaaattat tttacactaa aaactctctt ttaaaaattt agatccaatt ttaattttgt 300

tttctaaaag attgtatcca agaagtaaaa tttacatgga aaataaaatg cctataaatt 360

aaaaaatgtt atattttcgt gacctttaac cttaggaaca tttgataact attactttga 420

gattgcagtc ataggcaaca caaggtcttg gacaaacatg ttcgtgacac caaacacccc	480
cctcaaaatt aagtatatta taccaactca tttcatttgc ttgttacggt tgtgttttat	540
caatccttcc tcgtcttggt ttttcctcca aatttgtaat cttaaaattg gtgaaacatc	600
acatatttga ttctcaatct tagattttct accttttagg taatctatat tttgaaattg	660
aaattgaaat tgaattccgt gtaaaatcta taatatggga acccaattcg aatttaattg	720
tttatgtaaa ggccaataat gttccaaatt tatttcctta ttattattgt atattttgtc	780
cccaagtaca tcatagattg gctttcaatt ccaaattcat catggtatat ttttaggtgc	840
aaactattgt cgtagattta atcccctagt tttgttgatt ttttaaata gtactttcaa	900
caattttaaa ttttatttga ttggttataa acttcgggtg tgatttagtt gtc'caatttg	960
gattatattg tcattttcat acataaattt atttattttt gaaaaagtta tcttttagtc	1020
tttgaaattg aaatttttat gaatatgtgg atttagtccc tcaattctca aattaaccat	1080
cttcacaaga gtgagaaaca gagatgggag ggagaaaaat ggaaagataa aaaaagtatt	1140
tttcttcctc catgttatta ggtcacatca atatttataa tattttatat taaatttaat	1200
gatttctttt gggagaggta ctcttagacc tattttttta acaaaaatta ttggactcat	1260
aattttttaa ttgtccttta atttctttta tttgtatcta gactttataa agtttgagag	1320
ttttatattt taaggagaaa tatattaaaa tataaggtta gttttcatc actagataga	1380

cttatgatct tatacgagtg aatgaggttaa actctcaatt aaaattatct gaattttttc 1440
 aaaaattaaa atcatccatt ttgttaaatt aaaatttgaa gaaatttata ggatgcgtaa 1500
 gaattgatgc cttgttaatt ttcaaata attatagtaa aaattcttaa ttagtttact 1560
 aacaacgatt taaaagttaa ctttgatgtg ttgaacaata tttatcaaac caaatttgat 1620
 caagtggata tactaacaaa agttcaagat cttaaacttt aagtgaatta attttgacat 1680
 atatatatat ataaaaaaaa aaagttaggt gttaaagaa aactgaaaat tgttaaaaga 1740
 aaagaaaagg aggttataga taaaatgtgg atagaagag atgagttgta gatgcaaaaa 1800
 aatctttaga aacaatatga ttggctaact aagccctctc attacccac aaaatttctc 1860
 atatctttca ctcttcacca ctcatctcct cgtttctc taatattccc ccacttccac 1920
 tctctctcac acaatctcca acactactgc ccattcctct gttctttctc tctactctca 1980
 accacagagc ttcaagtacc c 2001

<210> 5

<211> 1899

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(1899)

<223> Trình tự khởi động thu được từ gen protein liên kết chất diệt lục a-b
13 của Cucumis melo.

<400> 5

aaaacccaaa taaatacaaa gttaatagat tttcaacaat gcggggatag ctgagttggg	60
agagcgtcag actgaagatc tgaaggctgc gtgttcgatc cacgctcacc gcatcttttt	120
tttgttctgt ttttcccagc gaatgaacta tccatacgtc gtcgtttgta tagccatgat	180
ccatgaagcg ctctaattac caatcatttt ttctttcttg gaattgatca agttacaaat	240
ataaaattat ttacactaa aaactctctt ttaaaaattt agatccaatt ttaattttgt	300
tttctaaaag attgtatcca agaagtaaaa ttacatgga aaataaaatg cctataaatt	360
aaaaaatggt atattttcgt gacctttaac cttaggaaca ttgataact attactttga	420
gattgcagtc ataggcaaca caaggctctg gacaaacatg ttcgtgacac caaacacccc	480
cctcaaaatt aagtatatta taccaactca ttcatcttgc ttgttacggt tgtgttttat	540
caatccttcc tcgtcttggt ttttctcca aatttgtaat cttaaaattg gtgaaacatc	600
acatatttga ttctcaatct tagattttct accttttagg taatctatat ttgaaattg	660
aaattgaaat tgaattccgt gtaaaatcta taatatggga acccaattcg aatttaattg	720
tttatgtaaa ggccaataat gttccaaatt tatttcctta ttattattgt atattttgtc	780
cccaagtaca tcatagattg gctttcaatt ccaaattccat catggtatat ttttaggtgc	840

aaactattgt cgtagattta atcccctagt tttgttgatt ttttaaaata gtactttcaa	900
caattttaaa ttttatttga ttggttataa acttcgggtg tgatttagtt gtccaatttg	960
gattatattg tcattttcat acataaatTT atttattttt gaaaaagtta tcttttagtc	1020
tttgaaattg aaatttttat gaatatgtgg atttagtccc tcaattctca aattaacccat	1080
cttcacaaga gtgagaaaca gagatgggag ggagaaaaat ggaaagataa aaaaagtatt	1140
tttcttcctc catgttatta ggtcacatca atatttataa tattttatat taaatttaat	1200
gatttctttt gggagaggta ctcttagacc tattttttta acaaaaatta ttggactcat	1260
aatTTTTTaa ttgtccttta atttctttta tttgtatcta gactttataa agtttgagag	1320
ttttatattt taaggagaaa tatattaaaa tataagggtta gttttcatat actagataga	1380
cttatgatct tatacgagtg aatgagttaa actctcaatt aaaattattt gaattttttc	1440
aaaaattaaa atcatccatt ttgttaaatt aaaatttgaa gaaatttata ggatgcgtaa	1500
gaattgatgc cttgttaatt ttcaaata attatagtaa aaattcttaa ttagtttact	1560
aacaacgatt taaaagttta ctttgatgtg ttgaacaata tttatcaaac caaatttgat	1620
caagtggata tactaacaaa agttcaagat cttaaacttt aagtgaatta attttgacat	1680
atatatatat ataaaaaaaa aaagttaggt gttaaaagaa aactgaaaat tgttaaaaga	1740
aaagaaaagg agggatataga taaaatgtgg atagaaagag atgagttgta gatgcaaaaa	1800

aatcttttaga aacaatatga ttggctaact aagccctctc attacccac aaaatttctc 1860

atatctttca ctcttcacca ctcatctcct cgtttcctc 1899

<210> 6

<211> 102

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(102)

<223> Trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein liên kết chất diệt lục a-b 13 của Cucumis melo.

<400> 6

ataatattcc cccacttcca ctctctctca cacaatctcc aacactactg cccattcctc 60

tgttctttct ctctactctc aaccacagag cttcaagtac cc 102

<210> 7

<211> 1014

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(1014)

<223> Trình tự EXP thu được từ gen tương tự protein ngón tay kẽm hộp B 24 của *Cucumis melo* chứa trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

<400> 7

aggctttttc gatctaaaat cacctgtaac aagtttaata atcgagaatt agtgaaagtg	60
tacctatfff aaaatagtaa ttagtatttt attcaataga tatgtttgaa atctaaaaaa	120
ttctottata acttggaat ttagataaca atgatgcaaa ccgcaaaaga gtatatata	180
aacattgaat aaactattag cttaatactc taaaatcagt ggttggaana aaaacttcca	240
cttacattta cgtgaaaagc gtcaaaaatta agaaaaatca tttgttaca tcacacataa	300
ataattctaa gcactctfff ttactatta gattagagaa taccagaaaa aaatttgatt	360
tgagttagta cactttgaga tgaaaacatt tataactaga acaatttgaa ataaagtaag	420
atgttcatt tatagggcat cgaatctatg actatfffgt ftttttggtg agttaaatgg	480
gatgaggaat cggaaaagaa agagcatttg attactaca gaagagtttg ttgtttccca	540
tcgtacaaaa tcaatcgata gtgtgttggt gttcgttggt catccctaaa caaaaagaga	600
tggtgtgaag aatcaaaagc atttagctaa ftttttagag ctctaaatt cctcagccac	660
aaaccaacgg agcttcacag ccacacaaat ggctcctct cttttccgcc ttgttgtctc	720
caccatcttt cttgattttg atttcctga atcctcaacc cttatcccct caccaccct	780
tctctttcct tcttcaatcc tccaccttt acttctcttt ctctatcccc ttctttctcc	840

attcttattc tctaataccc acttttcctc ttcttcttcc cttccatctc tccggcgcca 900

ctgttctact ggcggtttaa tttcatgggt tcttcttgat cttggagtag gaaacaggga 960

agtggagttt cggcgaatct attcaaaatc ttagtggttg ttcagaggga gaag 1014

<210> 8

<211> 815

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(815)

<223> Trình tự khởi động thu được từ gen tương tự protein ngón tay kẽm hộp B 24 của Cucumis melo.

<400> 8

aggctttttc gatctaaaat cacctgtaac aagttaata atcgagaatt agtgaaagtg 60

tacctatfff aaaatagtaa ttagtatfff attcaataga tatgtttgaa atctaaaaaa 120

ttctcttata acttggaat ttagataaca atgatgcaaa ccgcaaaaga gtatatacta 180

aacattgaat aaactattag cttactactc taaaatcagt ggttggaana aaaacttcca 240

cttacattta cgtgaaaagc gtcaaaatta agaaaaatca ttgtttacaa tcacacataa 300

ataattctaa gcactctfff ttactatta gattagagaa taccagaaaa aaatttgatt 360

tgagttagta cactttgaga tgaaaacatt tataactaga acaatttgaa ataaaagtaag 420
 atgttccatt tatagggcat cgaatctatg actattttgt ttttttggtg agttaaattg 480
 gatgaggaat cggaaaagaa agagcatttg attactacaa gaagagtttg ttgtttccca 540
 tcgtacaaaa tcaatcgata gtgtgttggt gttcgttggt catccctaaa caaaaagaga 600
 tgggtgtgaag aatcaaaagc atttagctaa ttttttagag ctccctaaatt cctcagccac 660
 aaaccaacgg agcttcacag ccacacaaat ggcctcctct cttttccgcc ttgttgtctc 720
 caccatcttt cttgatcttg atttcctga atcctcaacc cttatcccct caccaccct 780
 tctcttttct tcttcaatcc tccacctttt acttc 815

<210> 9

<211> 199

<212> ADN

<213> Cucumis melo

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(199)

<223> Trình tự dẫn đầu thu được từ gen tương tự protein ngón tay kẽm hộp B 24 của Cucumis melo.

<400> 9

tctttctcta tccccttctt tctccattct tattctctaa taccacttt tctcttctt 60

cttcccttcc atctctccgg cgccactggt ctactggcgg tttaatttca tgggttcttc 120

ttgatcttgg agtaggaaac aggggaagtgg agtttcggcg aatctattca aaatcttagt 180

ggttggttcag agggagaag 199

<210> 10

<211> 1887

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(1887)

<223> Trình tự EXP thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula* chứa trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

<400> 10

agtagtagta ggtgttgaca tttctttttt ttttgaacaa gaggagtga catttctaag 60

gtggctttgt taccacttga tagactttta gaatgtatgt caataagaat agaaaagaac 120

acaggtggtt taaattttga tctgaatgag acaatatgtg catgaagtaa agtttagatt 180

tcaaatatgc atacttaatg tgtctattgt gatatttaag gcatcattca tctctcttgc 240

ctcttgcctt cggtatatat gtatcggacc ataaaggga ccaaaaatga tttcagatac 300

ataaaattaa ttttcacatg tttaagtaat ctcaattgaa atggatttta ttccatcatt	360
aattctaaca tgaaattata tgtagttttt aactccaaac ataatttctc acttgccac	420
taacatatta attaacattg tcattccaaa agaaaaacaa aactgaatag aggtggagat	480
caacatgtga cttgaattat acatgtacgg ttgagaatta tattaaaaat ctaaagttgg	540
ggtcaacttg tgaaatagat tctcttcatt gtattttttt cacatttgat attatatagg	600
atagttgtga attgtgaaat tagataacca cgtgagcaa ttttgtaatt tagttgggat	660
taactgccac cttgtgttct tgaggttgaa cagtttacag ccaagtcttc ctttgctgt	720
ttgtcttgta catcttcata ttcacgtggt ttaagccact tattttcgtg ttttttttc	780
tctcttttct cttcaacata tagttgtaat aatagataat atagggttg atatgtttt	840
agttcttata gtgtgtttta gctcacatt ttttctttt cattgaccaa cagcatacac	900
tttttttgt gtatatttta gagactaaag tgcaatgaaa tcttatttat atggaaataa	960
aaaaaatgag catttttttg ttagtgaata tgtatgcagg atttgaaaaa ggaatgagat	1020
tcggagcctg ttcttttcat gactcctctt aattgagaca tgaaattcaa tgcttgacgt	1080
aaggataagt gttctattca atacgcgtaa gaaaagaatg agcagttcag atcaaatcga	1140
actttttatt cttgtaattg taatgttatt tttcgggtca cacaattaag tttgtttgc	1200
acattagtct gtaattcttc gggttattca catttcattt gatggtcaga ggcaaattga	1260

aagctaagca gtggtaattc taaagattcc cccgggaaaa aatagaaatg tctcctacgt 1320
tacctatact atgtgtaata tttaatttat tttgtcacat tgtatcaaat tagttttctca 1380
cattatgtac atttcaaaat gattcattaa attgcaatta aattcaccca tccgtttaac 1440
attaagttgg taattttctga gatgtatttg aaattattat gtaaacgaga tgcatTTgat 1500
agcaaaataa aaagatgttg ctgtttttca ctcaaactcc caatccaaac cttccaagt 1560
ttctgtattt ctctcagctt tgggtggacct aatttccttg gtcacattc acctctccaa 1620
aacatctaag caaccagatc aatgcatcca catggcacia agagagccac aatatcacta 1680
caaaatataa gcttggaat ccacatacta attcaccacc aataagatgt tgctgacttg 1740
tgcatatcct aatctacaat atcttatgat ttccaocgtg gccactcca acacttctat 1800
aaacctttgt atcctttctt cattcttcac aacaacacta gcttatacca ctaaagagaa 1860
caaacatcaa gaaacctcaa cgcctc 1887

<210> 11

<211> 1837

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(1837)

<223> Trình tự khởi động thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula*.

<400> 11

agtagtagta ggtgttgaca tttctttttt ttttgaacaa gaggagttga catttctaag	60
gtggctttgt taccacttga tagactttta gaatgtatgt caataagaat agaaaagaac	120
acaggtgggt taaattttga tctgaatgag acaatatttg catgaagtaa agtttagatt	180
tcaaatatgc atacttaatg tgtctattgt gatatttaag gcatcattca tctctcttgc	240
ctcttgccct cggtatatat gtatcggacc ataaaggga ccaaaaatga tttcagatac	300
ataaaaattaa ttttcacatg ttttaagtaat ctcaattgaa atggatttta ttccatcatt	360
aattctaaca tgaaattata tgtagttttt aactccaaac ataatttctc acttggtccac	420
taacatatta attaacattg tcattccaaa agaaaaacaa aactgaatag aggtggagat	480
caacatgtga cttgaattat acatgtacgg ttgagaatta tattaaaaat cttaaagttgg	540
ggtcaacttg tgaaatagat tctcttcatt gtattttttt cacatttgat attatatagg	600
atagttgtga attgtgaaat tagataacca cgtgagccaa ttttgtaatt tagttgggat	660
taactgccac cttgtgttct tgaggttgaa cagtttacag ccaagtcttc ctttgccctgt	720
ttgtcttgta catcttcata ttcacgtggg ttaagccact tattttcgtg ttttttttc	780
tctcttttct cttcaacata tagttgtaat aatagataat atagggttg atatgtttt	840

agttcttata gtgtgtttta gcctcacatt ttttctttt cattgaccaa cagcatcac	900
ttttttttgt gtatatttta gagactaaag tgcaatgaaa tcttatttat atggaaataa	960
aaaaaatgag ctttttttg ttagtgaata tgtatgcagg atttgaaaaa ggaatgagat	1020
tcggagcctg ttcttttcat gactcctctt aattgagaca tgaaattcaa tgcttgacgt	1080
aaggataagt gttctattca atacgcgtaa gaaaagaatg agcagttcag atcaaatacga	1140
actttttatt cttgtaattg taatgttatt tttcgggtca cacaattaag ttttgtttgc	1200
acattagtct gtaattcttc gggttattca ctttcatctt gatggtcaga ggcaaattga	1260
aagctaagca gtggtaatc taaagattcc cccgggaaaa aatagaaatg tctcctacgt	1320
tacctatact atgtgtaata ttttaatttat tttgtcacat tgtatcaaat tagtttctca	1380
cattatgtac atttcaaaat gattcattaa attgcaatta aattcaccca tccgtttaac	1440
attaagttgg taatttctga gatgtatttg aaattattat gtaaacgaga tgcatttgat	1500
agcaaaataa aaagatgttg ctgtttttca ctcaaactcc caatccaaac ccttccaagt	1560
ttctgtattt ctctcagctt tgggtggacct aatttccttg gctcacattc acctctccaa	1620
aacatctaag caaccagatc aatgcatcca catggcacia agagagccac aatatcacta	1680
caaaatataa gcttggaat ccacatacta attcaccacc aataagatgt tgctgacttg	1740
tgcatatcct aatctacaat atcttatgat ttccacgtg gccactccca acacttctat	1800

aaacctttgt atccttttctt cattcttcac aacaaca

1837

<210> 12

<211> 50

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(50)

<223> Trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula*.

<400> 12

ctagcttata ccactaaaga gaacaaacat caagaaacct caacgccctc

50

<210> 13

<211> 594

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(594)

<223> Trình tự EXP thu được từ gen tiền chất lục lạp hệ quang hóa II của *Medicago truncatula* chứa trình tự khởi động được liên kết chức năng 5' với trình tự dẫn đầu tự nhiên của nó.

<400> 13

ttactgttgg ttttggttaa atttggtatg ttgtgctatc tgttgagaaa aatgttgggt 60
 agcttatatt actccatatc agataagcct gacctcactc ccattagaag gaaacaaata 120
 tattaaagta caatattcat ttttttttgg gaatagatta attttgatgc attttcggtg 180
 taaaacattt tacatgctca acaaactca aaccatcttt tgtatgactt tttggattta 240
 agatagatat gataaaagtc aaatatttta atgatccaat agttatcatt gattgtcttg 300
 tacaaaattt ttacactgcc ggtacctatt agcatctttc ttatccttta aattcacatt 360
 aattaacaag catcaacaca agcccccaa aaccatttct agcattatca actattcaac 420
 gtggcattaa cttattggtc atatcattaa tgagataaga taatgtatgg tcctacccta 480
 ccacaaaagc tccattttt gtatgattta cattccatat attcattctt ccacttgccc 540
 acaatagaag ctatcacata gagactagtt cagaatccag atcacattgt agaa 594

<210> 14

<211> 552

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(552)

<223> Trình tự khởi động thu được từ gen tiền chất lục lập hệ quang hóa II của *Medicago truncatula*.

<400> 14

ttactgttgg ttttggctaa atttggtatg ttgtgctatc tgttgagaaa aatgttgggg	60
agcttatatt actccatata agataagcct gacctcactc ccattagaag gaaacaaata	120
tattaaagta caatattcat ttttttttgg gaatagatta attttgatgc attttcggtg	180
taaaacattt tacatgctca acaaattctca aaccatcttt tgtatgactt tttggattta	240
agatagatat gataaaagtc aaatatatta atgatccaat agttatcatt gattgtcttg	300
tacaaaattt ttacactgcc ggtacctatt agcatctttc ttatccttta aattcacatt	360
aattaacaag catcaacaca agcccccaa aaccatttct agcattatca actattcaac	420
gtggcattaa cttattggtc atatcattaa tgagataaga taatgtatgg tcctacccta	480
ccacaaaagc tcccatTTTT gtatgattta cattccatat attcattctt ccacttgccc	540
acaatagaag ct	552

<210> 15

<211> 42

<212> ADN

<213> Medicago truncatula

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(42)

<223> Trình tự dẫn đầu thu được từ gen tiền chất lục lập hệ quang hóa II của *Medicago truncatula*.

<400> 15

atcacataga gactagttca gaatccagat cacattgtag aa

42

<210> 16

<211> 1797

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(1797)

<223> Trình tự tăng cường thu được từ gen protein phức hợp thu ánh sáng b2 của *Medicago truncatula*.

<400> 16

agtagtagta ggtgttgaca tttctttttt ttttgaacaa gaggagtga catttctaag

60

gtggctttgt taccacttga tagactttta gaatgtatgt caataagaat agaaaagaac

120

acaggtgggt taaattttga tctgaatgag acaatatttg catgaagtaa agtttagatt

180

tcaaatatgc atacttaatg tgtctattgt gatatttaag gcatcattca tctctcttgc

240

ctcttgccct cggtatatat gtatcggacc ataaagggaa ccaaaaatga tttcagatac

300

ataaaattaa ttttcacatg ttttaagtaat ctcaattgaa atggatttta ttccatcatt

360

aattctaaca tgaaattata tgtagttttt aactccaaac ataatttctc acttgccac	420
taacatatta attaacattg tcattccaaa agaaaaacaa aactgaatag aggtggagat	480
caacatgtga cttgaattat acatgtacgg ttgagaatta tattaaaaat ctaaagttgg	540
ggtcaacttg tgaaatagat tctcttcatt gtatTTTTTTT cacatttgat attatatagg	600
atagttgtga attgtgaaat tagataacca cgtgagccaa ttttgtaatt tagttgggat	660
taactgccac cttgtgttct tgaggttgaa cagtttacag ccaagtcttc ctttgccgtg	720
ttgtcttgta catcttcata ttcacgtggt ttaagccact tattttcgtg ttttttttct	780
tctcttttct cttcaacata tagttgtaat aatagataat atagggttg atatgttttt	840
agttcttata gtgtgtttta gcctcacatt ttttctttt cattgaccaa cagcatacac	900
tttttttgt gtatatttta gagactaaag tgcaatgaaa tcttatattat atggaaataa	960
aaaaaatgag catttttttg ttagtgaata tgtatgcagg atttgaaaaa ggaatgagat	1020
tcggagcctg ttcttttcat gactcctctt aattgagaca tgaaattcaa tgcttgacgt	1080
aaggataagt gttctattca atacgcgtaa gaaaagaatg agcagttcag atcaaatcga	1140
actttttatt cttgtaattg taatgttatt tttcgggtca cacaattaag tttgtttgc	1200
acattagtct gtaattcttc gggttattca catttcattt gatggtcaga ggcaaattga	1260
aagctaagca gtggtaatc taaagattcc cccgggaaaa aatagaaatg tctcctacgt	1320

tacctatact atgtgtaata tttaatttat tttgtcacat tgtatcaaat tagtttctca 1380

cattatgtac atttcaaaat gattcattaa attgcaatta aattcaccca tccgtttaac 1440

attaagttgg taatttctga gatgtatttg aaattattat gtaaacgaga tgcatttgat 1500

agcaaaataa aaagatgttg ctgtttttca ctcaaactcc caatccaaac ccttccaagt 1560

ttctgtatct ctctcagctt tgggtggacct aatttccttg gctcacattc acctctccaa 1620

aacatctaag caaccagatc aatgcatcca catggcacia agagagccac aatatcacta 1680

caaaatataa gcttggaat ccacatacta attcaccacc aataagatgt tgctgacttg 1740

tgcatatcct aatctacaat atcttatgat ttccaccgtg gccactccca acacttc 1797

<210> 17

<211> 2001

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mã hóa cho beta-glucuronidaza (GUS) có intron xử lý được.

<400> 17

atgggtccgtc ctgtagaaac cccaaccgt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60

ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcgtt ggtgggaaaag cgcgttacaa 120

gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgatc agttcgccga tgcagatatt 180

cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca	240
ggccagcgta tcgtgctgcg ttctgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat	300
aatcaggaag tgatggagca tcaggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg	360
tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag ttctgtcttc tacctttgat atatatataa	420
taattatcat taattagtag taatataata tttcaaata ttttttcaaa ataaaagaat	480
gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tataatttaa ttataaactt	540
ttctaataata tgacaaaat ttgttgatgt gcaggtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa	600
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag	660
cagtcttact tccatgattt ctttaactat gccggaatcc atcgcagcgt aatgctctac	720
accacgccga acacctgggt ggacgatatc accgtgggtga cgcattgtgc gcaagactgt	780
aaccacgcgt ctgttgactg gcaggtgggt gccaatgggt atgtcagcgt tgaactgcgt	840
gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggt	900
aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaaggt tatctctatg aactgtgcgt cacagccaaa	960
agccagacag agtgtgatat ctaccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag	1020
ggcgaacagt tctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggcttttg tcgtcatgaa	1080
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta	1140

atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgatt acccttacgc tgaagagatg	1200
ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgcggcttt	1260
aacctctctt taggcattgg tttcgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa	1320
gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg	1380
cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg	1440
ccgcaagggtg cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg	1500
acgcgtccga tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacaccga taccatcagc	1560
gatctctttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat	1620
ttggaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat	1680
cagccgatta tcataccga atacggcgtg gatacgtag cgggctgca ctcaatgtac	1740
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt	1800
gatcgcgtca gcgccgtcgt cggatgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg	1860
caaggcatat tgcgcgttg cggtaacaag aaagggatct tactcgca ccgcaaaccg	1920
aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg	1980
cagcagggag gcaacaatg a	2001

<211> 315

<212> ADN

<213> *Gossypium barbadense*

<220>

<221> dấu hiệu hỗn hợp

<222> (1)..(315)

<223> Trình tự 3' UTR thu được từ gen *Gossypium barbadense* E6.

<400> 18

tgatcacctg tcgtacagta tttctacatt tgatgtgtga tttgtgaaga acatcaaaca 60

aaacaagcac tggctttaat atgatgataa gtattatggt aattaattaa ttggcaaaaa 120

caacaatgaa gctaaaattt tatttattga gccttgcggt taatttcttg tgatgatctt 180

tttttttatt ttctaattat atatagtttc ctttgctttg aaatgctaaa ggtttgagag 240

agttatgctc tttttttctt cctctttctt ttttaacttt atcatacaaa ttttgaataa 300

aaatgtgagt acatt 315