



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0038135

(51)⁷ C12N 15/87; C07H 21/04; C12N 5/04; (13) B
A01H 5/00; C12N 15/00

-
- (21) 1-2018-02943 (22) 19/12/2016
(86) PCT/US2016/067531 19/12/2016 (87) WO2017/112589 29/06/2017
(30) 62/270,180 21/12/2015 US; 62/364,715 20/07/2016 US
(45) 25/01/2024 430 (43) 25/12/2018 369A
(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)
800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America
(72) ELLIS, Christine, M. (CA); GOLEY, Michael, E. (US); LARUE, Clayton, T. (US);
LECLERE, Sherry, L. (US); QI, Qungang (CA); SHAO, Aihua (US); THAI, Kwan,
Y. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, THỰC VẬT, TẾ BÀO THỰC VẬT, BỘ PHẬN CỦA THỰC VẬT HOẶC HẠT GIỐNG CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT CHỐNG CHỊU CHẤT DIỆT CỎ VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CỎ ĐẠI TRONG MÔI TRƯỜNG SINH TRƯỞNG CÂY TRỒNG

(57) Sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp và các cấu trúc hữu ích để đem lại quá trình định vị trong tế bào gen được chuyển của các protein có hiệu quả ở các thực vật chuyển gen. Sáng chế còn đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp và các cấu trúc dùng để đem lại khả năng kháng hoặc khả năng chống chịu chất diệt cỏ cho thực vật, cũng như thực vật biểu hiện khả năng chống chịu chất diệt cỏ và các phương pháp dùng để sản xuất hoặc sử dụng thực vật như vậy.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế này đề cập đến các lĩnh vực về nông nghiệp, công nghệ sinh học thực vật, và sinh học phân tử. Cụ thể hơn là, sáng chế đề cập đến các chế phẩm và các phương pháp dùng để sản xuất các thực vật chuyển gen biểu hiện khả năng kháng hoặc khả năng chống chịu chất diệt cỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quá trình sản xuất các thực vật chuyển gen mới đem lại tiềm năng về thực vật cây trồng được cải thiện một cách đáng kể biểu hiện các tính trạng có lợi, như khả năng chống chịu chất diệt cỏ được cải thiện để cho phép có được các chiến lược kiểm soát cỏ dại được tăng cường. Tuy nhiên, trong khi các protein hữu ích cho việc tạo ra các tính trạng có lợi ở các cây trồng thì đã biết, thì quá trình định vị trong tế bào hữu hiệu (được gọi là hướng đích) và quá trình chế biến các protein tái tổ hợp này trong các tế bào thực vật chuyển gen vẫn còn là điều trở ngại đáng kể. Do đó, có nhu cầu về các peptit vận chuyển mới có khả năng định vị một cách hữu hiệu các protein tái tổ hợp trong phạm vi các tế bào thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN mã hóa peptit vận chuyển lục lạp (chloroplast transit peptide-CTP) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa dicamba monooxygenaza (DMO) hoặc protoporphyrinogen oxidaza (PPO), trong đó CTP này bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3. Theo các phương án nhất định, trình tự ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:7-14. Theo các phương án khác nữa, DMO hoặc PPO bao gồm polypeptit được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:18-27 và 40-59. Theo một phương án, trình tự ADN mã hóa DMO hoặc PPO bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:28-37 và 61-102. Theo các

phương án cụ thể, DMO hoặc PPO được định nghĩa là protein chống chịu chất diệt cỏ mà có khả năng đem lại khả năng chống chịu chất diệt cỏ khi được biểu hiện ở tế bào thực vật. Theo các phương án cụ thể, protein chống chịu chất diệt cỏ là protein DMO, và CTP này bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3, hoặc protein chống chịu chất diệt cỏ là protein PPO, và CTP này bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1 và 2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cấu trúc ADN bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp như được mô tả trong bản mô tả này được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào gen khởi đầu khác nguồn gốc có chức năng trong tế bào thực vật.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen được biến nạp bằng phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Theo các phương án cụ thể, thực vật này là thực vật một lá mầm. Thực vật một lá mầm mà có thể được sử dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cây ngô hoặc cây lúa mì. Theo một phương án khác, thực vật này là thực vật hai lá mầm. Thực vật hai lá mầm mà có thể được sử dụng với sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, đậu tương, bông, hoặc thực vật thuộc chi *Brassica*.

Còn theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp mà có mặt trong vật liệu thực vật không sống. Theo một ví dụ, các tế bào thực vật là trong phạm vi của sáng chế khi các tế bào thực vật này chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế này. Theo một phương án, các tế bào thực vật như vậy có thể là các tế bào thực vật có thể tái tạo được hoặc có thể là các tế bào thực vật không tái tạo được không có khả năng tái tạo được thành thực vật.

Còn theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất các sản phẩm hàng hóa mà bao gồm lượng có thể phát hiện được của phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế, bao gồm cả các sản phẩm được sản xuất nhờ đó. Theo các phương án nhất định, các sản phẩm hàng hóa được đề xuất theo sáng chế bao gồm các hạt giống không thể sống được hoặc các bộ phận của chúng, mô thực vật được khử nước, mô thực vật được đông lạnh, mô thực vật đã được chế biến, bột xay thô, bột xay mịn, phiên mỏng, cám và sợi. Các sản phẩm hàng hóa có thể là có thể sống được hoặc không thể sống được. Các sản phẩm hàng hóa không thể sống được bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở các hạt ngũ cốc và các hạt giống không thể sống được; các hạt giống đã được chế biến, các bộ phận của hạt giống, và các bộ phận của thực vật; mô thực vật được khử nước, mô thực vật được đông

lạnh, và mô thực vật đã được chế biến. Các sản phẩm hàng hóa theo sáng chế chứa lượng có thể phát hiện được của phân tử ADN tái tổ hợp như được mô tả trong bản mô tả này. Các phương pháp dùng để phát hiện phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp dùng để sản xuất thực vật chống chịu chất diệt cỏ bao gồm các bước gồm a) biến nạp tế bào thực vật bằng cấu trúc ADN theo sáng chế, và b) tái tạo thực vật từ tế bào thực vật đã được biến nạp mà chứa cấu trúc ADN này. Theo một phương án của phương pháp này, thực vật đã được tái tạo là có tính chống chịu đối với chất diệt cỏ được chọn lựa từ nhóm gồm chất ức chế PPO và dicamba.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thực vật chống chịu chất diệt cỏ bao gồm các bước gồm: a) lai thực vật bố mẹ chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế với chính nó hoặc với một thực vật thứ hai để tạo ra một hoặc nhiều thực vật thế hệ con; và b) chọn lựa thực vật thế hệ con chứa phân tử ADN đã nêu. Theo một phương án của phương pháp này, thực vật thế hệ con này là có tính chống chịu đối với chất diệt cỏ được chọn lựa từ nhóm gồm chất ức chế PPO và dicamba.

Còn theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp dùng để biểu hiện PPO hoặc DMO ở tế bào thực vật bao gồm việc đưa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế vào tế bào thực vật. Theo một phương án của sáng chế, phương pháp đưa phân tử ADN tái tổ hợp vào bao gồm việc biến nạp tế bào thực vật.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp dùng để kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ dại trong môi trường sinh trưởng cây trồng bao gồm các bước gồm: a) trồng hạt giống hoặc thực vật theo sáng chế trong môi trường sinh trưởng cây trồng; và b) áp dụng cho môi trường sinh trưởng cây trồng một lượng của dicamba hoặc chất diệt cỏ ức chế PPO hữu hiệu để kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ dại. Theo các phương án cụ thể, việc áp dụng chất diệt cỏ được thực hiện trước khi mọc hoặc sau khi mọc. Theo một phương án, lượng của chất diệt cỏ không gây thiệt hại cho hạt giống hoặc thực vật. Theo các phương án nhất định của phương pháp này, hạt giống hoặc thực vật này là hạt giống hoặc thực vật một lá mầm, như hạt giống hoặc cây ngô hoặc cây lúa mì. Theo các phương án khác, hạt giống hoặc thực vật này là hạt giống hoặc thực vật hai lá mầm, như đậu tương, bông, hoặc thực vật thuộc chi *Brassica*. Theo các phương án khác nữa, chất diệt cỏ là dicamba hoặc chất ức chế PPO.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Cây ngô chuyển gen F1 biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:43) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào APG6 (SEQ ID NO:1) hoặc 12G088600TP (SEQ ID NO:38) sau khi xử lý bằng việc áp dụng chất diệt cỏ là S-3100 ở mức 0,036 lb ai/mẫu Anh được áp dụng ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự axit amin của CTP xanh lục nhạt (APG6) và *Arabidopsis thaliana* bạch tạng.

SEQ ID NO:2 là trình tự axit amin của biến thể được tối ưu hóa đầu tận cùng amin của CTP APG6 của SEQ ID NO:1.

SEQ ID NO:3 là trình tự axit amin của CTP protein sốc nhiệt 90kDa (CR88) của *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO:4 là trình tự axit amin của CTP Ph.ShkG-CTP4.

SEQ ID NO:5 là trình tự axit amin của CTP Ps.RbcS-3C.

SEQ ID NO:6 là trình tự axit amin của CTP Os.Waxy.

SEQ ID NO:7-11 là các trình tự axit nucleic mã hóa CTP APG6 của SEQ ID NO:1 được tối ưu hóa cho quá trình biểu hiện thực vật một lá mầm hoặc thực vật hai lá mầm.

SEQ ID NO:12 là trình tự axit nucleic mã hóa CTP APG6 của SEQ ID NO:2.

SEQ ID NO:13 và 14 lần lượt là các trình tự axit nucleic mã hóa CTP At.CR88 được tối ưu hóa cho quá trình biểu hiện thực vật hai lá mầm hoặc quá trình biểu hiện thực vật một lá mầm.

SEQ ID NO:15-17 lần lượt là các trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO:4-6.

SEQ ID NO:18-27 là các trình tự axit amin mã hóa các biến thể dicamba monooxygenaza (DMO).

SEQ ID NO:28-37 lần lượt là các trình tự axit nucleic mã hóa các biến thể DMO của SEQ ID NO:18-27.

SEQ ID NO:38 là trình tự axit amin của peptit vận chuyển lục lạp của bông 12G088600TP được tối ưu hóa cho quá trình biểu hiện thực vật hai lá mầm.

SEQ ID NO:39 là các trình tự axit nucleic mã hóa SEQ ID NO:38.

SEQ ID NO:40 là trình tự axit amin của H_N90.

SEQ ID NO:41 là trình tự axit amin của H_N20.

SEQ ID NO:42 là trình tự axit amin của H_N60.

SEQ ID NO:43 là trình tự axit amin của H_N10.

SEQ ID NO:44 là trình tự axit amin của H_N30.

SEQ ID NO:45 là trình tự axit amin của H_N40.

SEQ ID NO:46 là trình tự axit amin của H_N50.

SEQ ID NO:47 là trình tự axit amin của H_N70.

SEQ ID NO:48 là trình tự axit amin của H_N100.

SEQ ID NO:49 là trình tự axit amin của H_N110.

SEQ ID NO:50-56 lần lượt là các trình tự axit amin thiếu metionin khởi đầu tương ứng với các SEQ ID NO:40, 41, 43, 44, 45, 46, và 48.

SEQ ID NO:57-58 là các biến thể axit amin của SEQ ID NO:50.

SEQ ID NO:59 là biến thể axit amin của SEQ ID NO:56.

SEQ ID NO:60 là trình tự axit amin của protoporphyrinogen oxidaza từ *Amaranthus tuberculatus* (cỏ waterhemp) (WH_PPO).

SEQ ID NO:61-70 lần lượt là các trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:40-49, được tối ưu hóa codon cho quá trình biểu hiện *E. coli*.

SEQ ID NO:71-80 lần lượt là các trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:40-49, được tối ưu hóa codon cho quá trình biểu hiện thực vật hai lá mầm.

SEQ ID NO:81-87 lần lượt là các trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:50-56, được tối ưu hóa codon cho quá trình biểu hiện thực vật hai lá mầm.

SEQ ID NO:88 và 91 lần lượt là các biến thể nucleotit của SEQ ID NO:50 và 51.

Các SEQ ID NO:89, 90, và 92 lần lượt là các trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:57-59.

SEQ ID NO:93-102 lần lượt là các trình tự nucleotit mã hóa SEQ ID NO:40-49, được tối ưu hóa codon cho quá trình biểu hiện thực vật một lá mầm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các peptit vận chuyển lục lạp (các CTP) dùng để định vị các protein chống chịu chất diệt cỏ trong phạm vi các tế bào là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, nhưng mức độ chế biến và định vị trong tế bào hữu hiệu đối với dạng kết hợp protein chống chịu chất diệt cỏ và CTP bất kỳ thì khó dự đoán. Quá trình định vị và quá trình chế biến xác định mức biểu hiện và chức năng của protein chống chịu chất diệt cỏ và vì vậy, ảnh hưởng đến kiểu

hình chống chịu chất diệt cỏ của thực vật, hạt giống hoặc tế bào chuyển gen chứa protein này. Các CTP khác nhau đã được kiểm tra với các protein chống chịu chất diệt cỏ hữu ích bao gồm các dicamba monooxygenaza (DMO) và các protoporphyrinogen oxidaza (PPO) ở các thực vật chuyển gen. Tuy nhiên, thường thấy được quá trình định vị và quá trình chế biến kém hoặc không hoàn chỉnh của protein này.

Sáng chế khắc phục các điều trở ngại này bằng cách đem lại các phân tử ADN tái tổ hợp mới có khả năng đem lại mức chế biến và định vị lục lạp được cải thiện, cũng như các chế phẩm và phương pháp sử dụng các phân tử này. Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm trình tự ADN mã hóa CTP được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO hoặc PPO. Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế đem lại quá trình định vị lục lạp của DMO hoặc PPO và khả năng chống chịu đối với chất diệt cỏ PPO hoặc dicamba được cải thiện ở thực vật chứa các phân tử ADN tái tổ hợp.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa protein chống chịu chất diệt cỏ. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm các trình tự ADN mã hóa các CTP, như CTP có trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3, được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa protein DMO, ví dụ, protein DMO có trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:18-27. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm các trình tự ADN mã hóa các CTP, như CTP có trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3, được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa protein PPO, như protein PPO có trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:40-60.

Các phân tử ADN tái tổ hợp

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tái tổ hợp” được dùng để chỉ ADN phi tự nhiên, polypeptit, protein, hạt giống, thực vật hoặc tế bào là kết quả của công nghệ xử lý gen và như vậy bình thường sẽ không tìm thấy trong tự nhiên và được tạo ra bằng sự can thiệp của con người. “Phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN bao gồm trình tự ADN mà không có trong tự nhiên và là kết quả của sự can thiệp của con người, như phân tử ADN bao gồm của dạng kết hợp của ít nhất hai phân tử ADN khác nguồn gốc với nhau. Một ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự

được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa protein DMO bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:18-27. Các ví dụ về protein DMO được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Các dicamba monooxygenaza (DMO)

PRT SEQ ID NO	ADN SEQ ID NO	Chiều dài PRT	Vị trí được dự đoán 2	Vị trí được dự đoán 3	Vị trí được dự đoán 112	Cách sử dụng codon
18	28	340	Leu	Thr	Trp	thực vật hai lá mầm
19	29	339	Thr	Phe	Trp (ở 111)	thực vật hai lá mầm
20	30	340	Leu	Thr	Trp	thực vật một lá mầm
21	31	340	Ala	Thr	Cys	thực vật hai lá mầm
11	32	340	Leu	Thr	Cys	thực vật hai lá mầm
23	33	340	Ala	Thr	Cys	vi khuẩn
24	34	340	Ala	Thr	Trp	thực vật hai lá mầm
25	35	340	Ala	Thr	Trp	thực vật một lá mầm
26	36	340	Leu	Thr	Cys	thực vật hai lá mầm

27	37	340	Leu	Thr	Trp	thực vật hai lá mầm
----	----	-----	-----	-----	-----	---------------------------

Một ví dụ khác về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa protein PPO bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:40-60. Hạt giống, thực vật hoặc tế bào tái tổ hợp là hạt giống, thực vật hoặc tế bào chứa ADN chuyển gen, ví dụ, hạt giống, thực vật, bộ phận của thực vật hoặc tế bào chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các ví dụ về protein PPO được đưa ra trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Các protoporphyrinogen oxidaza (PPO)

PPO	Protein SEQ ID NO	ADN vi khuẩn SEQ ID NO	ADN được tối ưu hóa của thực vật hai lá mầm SEQ ID NO	ADN được tối ưu hóa của thực vật một lá mầm SEQ ID NO
H_N10	43, 52	64	74, 83	96
H_N20	41, 51	62	72, 82, 91	94
H_N30	44, 53	65	75, 84	97
H_N40	45, 54	66	76, 85	98
H_N50	46, 55	67	77, 86	99
H_N60	42	63	73	95
H_N70	47	68	78	100
H_N90	40, 50, 57, 58	61	71, 81, 88, 89, 90	93
H_N100	48, 56, 59	69	79, 87, 92	101
H_N110	49	70	80	102
WH_PPO	60	không sẵn có	không sẵn có	không sẵn có

Các ví dụ về trình tự CTP mà có thể được sử dụng theo sáng chế được đưa ra trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Các peptit vận chuyển lục lạp (CTP)

CTP	PRT SEQ ID NO	ADN SEQ ID NO	Cách sử dụng codon
APG6	1	7, 10, 11	thực vật một lá mầm
		8, 9	thực vật hai lá mầm
N-opt APG6	2	12	thực vật hai lá mầm
At.CR88	3	13	thực vật hai lá mầm
		14	thực vật một lá mầm
Ph.ShkG-CTP4	4	15	thực vật một lá mầm
Ps.RbcS-3C	5	16	thực vật hai lá mầm
Os.waxy	6	17	thực vật một lá mầm
12G088600TP	38	39	thực vật hai lá mầm

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân tử ADN được phân lập” có nghĩa là phân tử ADN có mặt một mình hoặc ở dạng kết hợp với các chế phẩm khác nhưng không nằm trong phạm vi môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự mã hóa protein và trình tự CTP khác nguồn gốc là phân tử ADN được phân lập khi có mặt trong hệ gen của tế bào, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen vì các hợp phần của phân tử ADN tái tổ hợp đó không nằm trong môi trường tự nhiên của chúng (đó là, hệ gen của sinh vật mà trong đó mỗi hợp phần được quan sát thấy đầu tiên). Phân tử ADN tái tổ hợp có mặt trong hệ gen thực vật chuyển gen là phân tử ADN được phân lập với điều kiện là phân tử ADN tái tổ hợp không được tìm thấy một cách tự nhiên trong hệ gen thực vật đó và vì vậy, được phân lập từ môi trường tự nhiên của nó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “công nghệ xử lý gen” được dùng để chỉ quá trình tạo ra bằng sự can thiệp của con người vào ADN, protein hoặc sinh vật mà bình thường sẽ không tìm thấy trong tự nhiên. Công nghệ xử lý gen có thể được sử dụng để sản xuất ADN, polypeptit, protein, hạt giống, thực vật hoặc tế bào mà đã được hình dung ra và được tạo ra trong phòng thí nghiệm bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật trong số các kỹ thuật của công nghệ sinh học như sinh học phân tử, hóa sinh học protein, quá trình biến nạp vi khuẩn, và quá trình biến nạp thực vật. Ví dụ, công nghệ xử lý gen có thể được sử dụng để tạo ra gen thể khảm bao gồm phân tử ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3, được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào protein DMO bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:18-27, và tùy ý có thể còn bao gồm gen khởi đầu khác nguồn gốc có chức năng trong tế bào thực vật. Theo một ví dụ khác, công nghệ xử lý gen có thể được sử dụng để tạo ra gen thể khảm bao gồm phân tử ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm SEQ ID NO:1-3, được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào protein PPO bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:40-60, và tùy ý có thể còn bao gồm gen khởi đầu khác nguồn gốc có chức năng trong tế bào thực vật. Có thể tạo ra gen thể khảm như vậy bằng cách sử dụng một hoặc nhiều kỹ thuật trong số các kỹ thuật của sinh học phân tử, như tạo dòng vô tính gen, kết nối ADN, và tổng hợp ADN.

Thuật ngữ “gen được chuyển” được dùng để chỉ phân tử ADN được sát nhập theo cách nhân tạo vào hệ gen của sinh vật do sự can thiệp của con người, như bằng các phương pháp biến nạp thực vật. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chuyển gen” có nghĩa là bao gồm gen được chuyển, ví dụ, “thực vật chuyển gen” được dùng để chỉ thực vật bao gồm gen được chuyển trong hệ gen của nó và “tính trạng chuyển gen” được dùng để chỉ đặc điểm hoặc kiểu hình được chuyển hoặc đem lại bởi sự có mặt của gen được chuyển được sát nhập vào hệ gen thực vật. Do sự thay đổi hệ gen như vậy, thực vật chuyển gen là thứ khác một cách khác biệt với thực vật loại hoang dại có liên quan và tính trạng chuyển gen là tính trạng không được tìm thấy một cách tự nhiên ở thực vật loại hoang dại. Các thực vật chuyển gen theo sáng chế bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp được đề xuất theo sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “khác nguồn gốc” được dùng để chỉ mối quan hệ giữa hai vật liệu trở lên được tạo ra từ các nguồn khác nhau và vì vậy, bình thường là không gắn liền trong tự nhiên. Ví dụ, protein DMO là khác nguồn gốc so với

CTP được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được nếu dạng kết hợp như vậy bình thường là không được tìm thấy trong tự nhiên. Theo một ví dụ khác, phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa CTP được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào protein DMO là khác nguồn gốc so với gen khởi đầu được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được mà có chức năng trong tế bào thực vật nếu dạng kết hợp như vậy bình thường là không được tìm thấy trong tự nhiên. Một phân tử ADN tái tổ hợp cụ thể cũng có thể là khác nguồn gốc so với tế bào, hạt giống, hoặc sinh vật mà nó được chèn vào khi nó thường không có một cách tự nhiên trong tế bào, hạt giống, hoặc sinh vật cụ thể đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “phân tử ADN mã hóa protein” hoặc “phân tử ADN mã hóa polypeptit” được dùng để chỉ phân tử ADN bao gồm trình tự ADN mà mã hóa protein hoặc polypeptit, như protein hoặc polypeptit để đem lại khả năng chống chịu chất diệt cỏ hoặc kiểm soát côn trùng. “Trình tự mã hóa protein” hoặc “trình tự mã hóa polypeptit” có nghĩa là trình tự ADN mà mã hóa protein hoặc polypeptit. “Trình tự” có nghĩa là dạng sắp xếp tuần tự của các nucleotit hoặc các axit amin. Các đường biên của trình tự mã hóa trình tự protein hoặc trình tự mã hóa polypeptit thường được xác định bằng codon khởi đầu quá trình dịch mã ở đầu tận cùng 5' và codon kết thúc quá trình dịch mã ở đầu tận cùng 3'. Phân tử mã hóa protein hoặc phân tử mã hóa polypeptit có thể bao gồm trình tự ADN mã hóa trình tự protein hoặc trình tự polypeptit. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “quá trình biểu hiện gen được chuyển”, “biểu hiện gen được chuyển”, “quá trình biểu hiện protein”, “quá trình biểu hiện polypeptit”, “biểu hiện protein”, và “biểu hiện polypeptit” có nghĩa là quá trình sản xuất protein hoặc polypeptit thông qua quá trình phiên mã phân tử ADN thành ARN thông tin (mARN) và dịch mã ARN thông tin thành các chuỗi polypeptit, các phần này cuối cùng có thể được gấp thành các protein. Phân tử ADN mã hóa protein hoặc phân tử ADN mã hóa polypeptit có thể được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào gen khởi đầu khác nguồn gốc trong cấu trúc ADN để sử dụng trong việc biểu hiện protein hoặc polypeptit trong tế bào được biến nạp bằng phân tử ADN tái tổ hợp. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được” có nghĩa là hai phân tử ADN được liên kết theo phương thức sao cho một phân tử có thể ảnh hưởng đến chức năng của phân tử kia. Các phân tử ADN được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được có thể là bộ phận của một phân tử liên tiếp đơn lẻ và có thể là liền kề hoặc có thể không liền kề. Ví dụ, một gen khởi đầu được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được với phân tử ADN mã hóa protein hoặc phân tử ADN mã hóa polypeptit

trong cấu trúc ADN trong đó hai phân tử ADN này được sắp xếp sao cho gen khởi đầu này có thể ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện của gen được chuyển.

Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm trình tự ADN mã hóa DMO được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự CTP. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “dicamba monooxygenaza” hoặc “DMO” có nghĩa là oxygenaza có khả năng xúc tác theo kiểu enzym quá trình suy biến của dicamba (axit 3,6-diclo-o-anisic) thành axit 3,6-diclosalixylic (3,6-DCSA), như dicamba monooxygenaza được mã hóa bởi gen demetylaza (dmo) từ *Stenotrophomonas maltophilia*. Các dicamba monooxygenaza là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các trình tự protein được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:18-27 và được nhận diện trong Bảng 1.

Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm trình tự ADN mã hóa PPO được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự CTP. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “protoporphyrinogen oxidaza” hoặc “PPO” có nghĩa là oxidaza có khả năng chuyển hóa protoporphyrinogen IX theo kiểu enzym thành protoporphyrin IX. Các protoporphyrinogen oxidaza là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các trình tự protein được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:40-60 và được nhận diện trong Bảng 2.

Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm trình tự ADN mã hóa trình tự CTP được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào các phân tử ADN mã hóa protein được đề xuất theo sáng chế, nhờ đó CTP tạo thuận lợi cho quá trình định vị phân tử protein tái tổ hợp trong phạm vi tế bào. Các CTP còn được gọi trong lĩnh vực kỹ thuật này là các trình tự tín hiệu, các trình tự hướng đích, các peptit hướng đích, và các trình tự định vị. Các lục lạp còn được gọi trong lĩnh vực kỹ thuật này là các lục thể. Bằng cách tạo thuận lợi cho quá trình định vị protein trong phạm vi tế bào, CTP đảm bảo quá trình định vị của protein vào lục lạp để có được hoạt tính enzym tối ưu và có thể làm tăng hiện tượng tích tụ của protein tái tổ hợp và bảo vệ protein khỏi quá trình suy biến do thủy phân protein. Sau khi chuyển vị vào lục lạp, CTP thường được phân cắt khỏi protein, còn được gọi là quá trình chế biến. Quá trình chế biến CTP có thể là hoàn chỉnh (có nghĩa là CTP hoàn chỉnh được phân cắt khỏi đầu mút đầu tận cùng amin của protein), không hoàn chỉnh (có nghĩa là một hoặc nhiều axit amin của CTP vẫn còn trên đầu mút đầu tận cùng amin của protein), hoặc đem lại hiện tượng loại bỏ một hoặc nhiều axit amin khỏi đầu mút đầu tận cùng amin của protein. Quá trình chế biến hoàn chỉnh của CTP từ protein DMO làm tăng mức tích tụ protein, nhờ đó làm tăng khả năng chống chịu dicamba và làm giảm mức tổn thương ở hạt

giống, sinh vật hoặc tế bào chuyển gen sau khi áp dụng chất diệt cỏ. Các CTP được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:1-6 và 38, và được nhận diện trong Bảng 3. Trình tự ADN mã hóa mỗi CTP, được tối ưu hóa để có được sự biểu hiện ở thực vật hai lá mầm và thực vật một lá mầm, được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:7-17 và 39.

Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế này có thể được tổng hợp và được cải biến bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, một cách hoàn chỉnh hoặc một phần, đặc biệt là khi mà thích hợp để đem lại các trình tự hữu ích cho quá trình thao tác ADN (như các vị trí nhận biết enzym giới hạn hoặc các vị trí tạo dòng vô tính dựa trên quá trình tái tổ hợp), các trình tự được ưu tiên ở thực vật (như cách sử dụng codon-thực vật hoặc các trình tự liên ứng Kozak), hoặc các trình tự hữu ích cho dạng thiết kế cấu trúc ADN (như trình tự đệm hoặc trình tự liên kết). Các phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế này bao gồm các trình tự ADN bị suy biến mã hóa cùng một trình tự axit amin với trình tự ADN được đề xuất trong bản mô tả này. Có thể tạo ra các trình tự ADN bị suy biến bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bảng codon ADN. Sáng chế này bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp và các protein có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, độ đồng nhất trình tự ít nhất 95%, độ đồng nhất trình tự ít nhất 96%, độ đồng nhất trình tự ít nhất 97%, độ đồng nhất trình tự ít nhất 98%, và độ đồng nhất trình tự ít nhất 99% với trình tự bất kỳ trong số phân tử ADN tái tổ hợp hoặc trình tự polypeptit được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể bao gồm trình tự ADN có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100% với trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:7-14 hoặc với trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:28-37 và 61-102. Phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế có thể mã hóa trình tự protein có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, ít nhất 99%, hoặc 100% với trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3; hoặc với trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:18-27 và 40-59.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm” hoặc “độ đồng nhất trình tự tính theo %” được dùng để chỉ tỷ lệ phần trăm của các nucleotit hoặc axit amin đồng nhất ở trình tự polypeptit hoặc trình tự polynucleotit tuyến tính của trình tự tham chiếu (“truy vấn”) (hoặc dải bổ trợ của nó) so với trình tự kiểm tra (“đối tượng”) (hoặc dải bổ trợ của nó) khi hai trình tự này được xếp thẳng hàng một

cách tối ưu (có các dạng xóa bỏ, các dạng chèn nucleotit hoặc axit amin thích hợp, hoặc các khoảng trống có tổng số là nhỏ hơn 20 phần trăm của trình tự tham chiếu trên khắp cửa sổ so sánh). Dạng xếp thẳng hàng tối ưu của các trình tự dùng để xếp thẳng hàng cửa sổ so sánh là đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được thực hiện bằng các công cụ như thuật toán về độ tương đồng cục bộ của Smith và Waterman, thuật toán về dạng xếp thẳng hàng theo độ tương đồng của Kimman và Wunsch, phương pháp tìm kiếm độ tương đồng của Pearson và Lipman, và bằng các thao tác thực hiện được vi tính hóa của các thuật toán này như GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA sẵn có trong vai trò là một phần của gói phần mềm Phân tích Trình tự của GCG® Wisconsin Package® (Accelrys Inc., San Diego, CA), MEGAlign (DNASTar Inc., 1228 S. Park St., Madison, WI 53715), và MUSCLE (phiên bản 3.6) (Edgar, *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-7, 2004) có các thông số mặc định. “Phân số độ đồng nhất” của các đoạn được xếp thẳng hàng của trình tự kiểm tra và trình tự tham chiếu là số hợp phần đồng nhất mà hai trình tự được xếp thẳng hàng đều có chia cho tổng số của các hợp phần trong đoạn trình tự tham chiếu, đó là, toàn bộ trình tự tham chiếu hoặc một phần được xác định nhỏ hơn của trình tự tham chiếu. Độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm được thể hiện ở dạng phân số độ đồng nhất nhân với 100. Việc so sánh một hoặc nhiều trình tự có thể là với trình tự có chiều dài đầy đủ hoặc một phần của nó, hoặc với một trình tự dài hơn.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “cấu trúc ADN” là phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm hai trình tự ADN khác nguồn gốc trở lên. Các cấu trúc ADN là hữu ích cho quá trình biểu hiện gen được chuyển và có thể được chứa trong các vật truyền và các plasmit. Các cấu trúc ADN có thể được sử dụng ở các vật truyền vì mục đích biến nạp, đó là việc đưa ADN khác nguồn gốc vào tế bào chủ, để tạo ra các tế bào và thực vật chuyển gen, và như vậy có thể còn được chứa trong ADN lập thể hoặc ADN hệ gen của hạt giống, tế bào, bộ phận của thực vật hoặc thực vật chuyển gen. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vật truyền” có nghĩa là phân tử ADN tái tổ hợp bất kỳ mà có thể được sử dụng vì mục đích biến nạp thực vật. Các phân tử ADN tái tổ hợp như được nêu ra trong danh mục trình tự, có thể, ví dụ, được chèn vào vật truyền trong vai trò là một phần của cấu trúc có phân tử ADN tái tổ hợp được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào phân tử biểu hiện gen mà hoạt động ở thực vật để làm ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện protein được mã hóa bởi phân tử ADN tái tổ hợp. Các phương pháp dùng để kiến tạo cấu trúc ADN và vật truyền là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hợp phần của cấu trúc ADN, hoặc vật truyền

chứa cấu trúc ADN, nhìn chung bao gồm một hoặc nhiều phần tử biểu hiện gen được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN có thể phiên mã được, như các phần tử sau đây: gen khởi đầu dùng cho quá trình biểu hiện ADN được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được, phân tử ADN mã hóa protein được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được, và vùng không được dịch mã 3'. Các phần tử biểu hiện gen hữu ích trong việc thực hiện sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều phần tử trong số các loại phần tử sau đây: gen khởi đầu, vùng không được dịch mã 5', yếu tố tăng cường, gen dẫn đầu, phần tử tác động cis, vùng nội, vùng không được dịch mã 3', và một hoặc nhiều gen đánh dấu được chuyển có thể chọn lựa được.

Các cấu trúc ADN theo sáng chế có thể bao gồm gen khởi đầu được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào phân tử ADN mã hóa protein được đề xuất theo sáng chế, nhờ đó gen khởi đầu thúc đẩy quá trình biểu hiện phân tử protein tái tổ hợp. Các gen khởi đầu hữu ích trong việc thực hiện sáng chế bao gồm những loại mà hoạt động trong tế bào để có được quá trình biểu hiện một polynucleotit được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được, như gen khởi đầu của vi khuẩn hoặc gen khởi đầu của thực vật. Các gen khởi đầu thực vật thì đa dạng và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm những loại mà có thể kích thích được, của virus, tổng hợp, cơ hữu, được điều hòa theo thời gian, được điều hòa theo không gian, và/hoặc được điều hòa theo thời gian-không gian.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “đối chứng âm” và “đối chứng dương” có nghĩa là đối chứng thử nghiệm được thiết kế vì các mục đích so sánh. Ví dụ, đối chứng âm hoặc đối chứng dương trong phép phân tích thực vật chuyển gen có thể là thực vật của cùng một loại với thực vật thử nghiệm (đó là, thực vật cần được kiểm tra) nhưng không chứa dạng chèn chuyển gen, phân tử ADN tái tổ hợp, hoặc cấu trúc ADN của thực vật thử nghiệm. Một ví dụ về thực vật hữu ích dùng cho việc so sánh với cây ngô chuyển gen là ngô LH244 không chuyển gen (U.S. Patent No. 6,252,148), hoặc ngô 01DKD2 không chuyển gen (U.S. Patent No. 7,166,779), dùng cho việc so sánh với cây đậu tương chuyển gen là đậu tương A3555 không chuyển gen (U.S. Patent No. 7,700,846), hoặc đậu tương A3244 không chuyển gen (U.S. Patent No. 5,659,114, PVP 9600246), dùng cho việc so sánh với cây cải dầu hay *Brassica napus* chuyển gen là dòng Phục hồi 65037 của giống *Brassica napus* không chuyển gen, dùng cho việc so sánh với cây lúa mì chuyển gen là chất mầm nguyên sinh của giống lúa mì Samson không chuyển gen (PVP 1994), và dùng

cho việc so sánh với cây bông chuyển gen là DP393 không chuyển gen (U.S. Patent No. 6,930,228 PVP 200400266).

Các thực vật chuyển gen

Một khía cạnh của sáng chế bao gồm các tế bào thực vật chuyển gen, mô thực vật chuyển gen, các thực vật chuyển gen, và các hạt giống chuyển gen mà bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp được đề xuất theo sáng chế. Các tế bào, mô, thực vật và hạt giống này chứa các phân tử ADN tái tổ hợp biểu hiện khả năng chống chịu đối với các chất diệt cỏ.

Việc chèn ADN chuyển gen (được gọi là “gen được chuyển”) vào hệ gen của thực vật có thể được thực hiện bằng hành động biến nạp thực vật và đem lại quá trình tạo ra một trình tự phân tử hệ gen chuyển gen mới, được gọi là “sự biến”. Mỗi sự biến là độc nhất và trình tự ADN của sự biến là đặc trưng đối với sự biến. Các phương pháp thích hợp dùng cho quá trình biến nạp các tế bào thực vật chủ đề sử dụng với sáng chế này hầu như bao gồm phương pháp bất kỳ mà nhờ đó ADN có thể được đưa vào tế bào (ví dụ, trường hợp cấu trúc ADN tái tổ hợp được tích hợp một cách vững chắc vào nhiễm sắc thể của thực vật) và đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cấu trúc ADN tái tổ hợp được chèn vào. Các phương pháp làm ví dụ dùng để đưa cấu trúc ADN tái tổ hợp vào thực vật bao gồm hệ thống biến nạp *Agrobacterium* và bắn phá hạt ADN, cả hai phương pháp này thì đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp làm ví dụ khác dùng để đưa cấu trúc ADN tái tổ hợp vào thực vật là phương pháp chèn cấu trúc ADN tái tổ hợp vào hệ gen thực vật ở vị trí được xác định trước bằng các phương pháp của quá trình tích hợp hướng vị trí. Quá trình tích hợp hướng vị trí có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng việc sử dụng các nucleaza dạng ngón tay kềm, các meganucleaza nguyên thể hoặc được xử lý bằng công nghệ, TALE-endonucleaza, hoặc endonucleaza được hướng dẫn bởi ARN (ví dụ, hệ thống CRISPR/Cas9). Sau đó, có thể tái tạo các thực vật chuyển gen từ tế bào thực vật được biến nạp bằng các phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật. Một thực vật chuyển gen có tính đồng hợp tử so với gen được chuyển (đó là, hai bản sao alen của gen được chuyển) có thể thu được bằng quá trình tự thụ phấn (tự lai tạo) thực vật chuyển gen mà chứa một alen gen được chuyển đơn lẻ với chính nó, ví dụ, thực vật R0, để tạo ra hạt giống R1. Một phân tử số hạt giống R1 được tạo ra sẽ là có tính đồng hợp tử so với gen được chuyển. Thực vật được sinh trưởng từ hạt giống R1 này mầm có thể được kiểm tra về đặc tính hợp tử, thông thường bằng cách sử dụng thử nghiệm SNP, phương pháp giải trình tự ADN, hoặc thử

nghiệm khuếch đại nhiệt mà cho phép có được sự khác biệt giữa các dị hợp tử và các đồng hợp tử, được gọi là thử nghiệm về đặc tính hợp tử.

Thực vật, các hạt giống, các bộ phận của thực vật, mô thực vật, và các tế bào được đề xuất theo sáng chế có thể biểu hiện khả năng chống chịu chất diệt cỏ đối với dicamba. Dicamba có thể được áp dụng cho diện tích sinh trưởng thực vật bao gồm thực vật và hạt giống được đề xuất theo sáng chế trong vai trò là phương pháp dùng để kiểm soát cỏ dại, bao gồm việc phòng ngừa sự sinh trưởng của cỏ dại. Thực vật và hạt giống được đề xuất theo sáng chế có tính trạng chống chịu chất diệt cỏ và như vậy là có tính chống chịu đối với việc áp dụng dicamba. Mức áp dụng chất diệt cỏ có thể là tỷ lệ thương mại được khuyến nghị (1X) hoặc phân số hoặc bội số bất kỳ của nó, như hai lần tỷ lệ thương mại được khuyến nghị (2X). Các tỷ lệ áp dụng dicamba có thể được biểu hiện ở dạng đương lượng axit cho mỗi pao cho mỗi mẫu Anh (lb ae/mẫu Anh) hoặc đương lượng axit cho mỗi gam cho mỗi hecta (g ae/ha). Diện tích sinh trưởng thực vật có thể có hoặc có thể không có thực vật là cỏ dại vào thời điểm áp dụng chất diệt cỏ. Liều lượng hữu hiệu về phương diện diệt cỏ của dicamba để sử dụng ở diện tích dùng để kiểm soát cỏ dại nên gồm một khoảng từ khoảng chừng 0,1X đến khoảng chừng 30X (các) tỷ lệ trên nhãn trong mùa sinh trưởng. Tỷ lệ trên nhãn 1X của dicamba là 0,5 lb ae/mẫu Anh. Tỷ lệ chất diệt cỏ có thể được chuyển đổi giữa đơn vị đo kiểu Anh và đơn vị đo mét ở dạng: $(\text{lb ai/ac}) * 1,12 = (\text{kg ai/ha})$ và $(\text{kg ai/ha}) * 0,89 = (\text{lb ai/ac})$.

Thực vật, hạt giống, các bộ phận của thực vật, mô thực vật, và các tế bào có thể biểu hiện khả năng chống chịu đối với một hoặc nhiều chất ức chế PPO, được gọi là các chất diệt cỏ PPO. Một hoặc nhiều chất diệt cỏ PPO có thể được áp dụng cho diện tích sinh trưởng thực vật bao gồm thực vật và hạt giống được đề xuất theo sáng chế trong vai trò là phương pháp dùng để kiểm soát cỏ dại, bao gồm việc phòng ngừa sự sinh trưởng của cỏ dại. Thực vật và hạt giống được đề xuất theo sáng chế có tính trạng chống chịu chất diệt cỏ và như vậy là có tính chống chịu đối với việc áp dụng một hoặc nhiều chất diệt cỏ PPO. Mức áp dụng chất diệt cỏ có thể là tỷ lệ thương mại được khuyến nghị (1X) hoặc phân số hoặc bội số bất kỳ của nó, như hai lần tỷ lệ thương mại được khuyến nghị (2X). Diện tích sinh trưởng thực vật có thể có hoặc có thể không có thực vật là cỏ dại vào thời điểm áp dụng chất diệt cỏ. Liều lượng hữu hiệu về phương diện diệt cỏ của chất diệt cỏ PPO để sử dụng ở diện tích dùng để kiểm soát cỏ dại nên gồm một khoảng từ khoảng chừng 0,1X đến khoảng chừng 30X (các) tỷ lệ trên nhãn trong mùa sinh trưởng. Các chất diệt cỏ PPO là đã

biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và có bán trên thị trường. Các ví dụ về chất diệt cỏ PPO bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các diphenylete (như acifluorfen, các este và muối của nó, aclonifen, bifenox, các este và muối của nó, etoxyfen, các este và muối của nó, fluoronitrofen, furyloxyfen, halosafen, chlometoxyfen, fluoroglycofen, các este và muối của nó, lactofen, các este và muối của nó, oxyfluorfen, và fomesafen, các este và muối của nó); các thiadiazol (như fluthiacet-metyl và thidiazimin); các pyrimidindion hoặc các phenyluraxil (như benzfendizon, butafenacil, etyl [3-2-clo-4-flo-5-(1-metyl-6-triflometyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-3-yl)phenoxy]-2-pyridyloxy]axetat (Số Đăng ký CAS 353292-31-6 và được gọi trong bản mô tả này là S-3100), flupropacil, saflufenacil, và tiafenacil); các phenylpyrazol (như fluazolat, pyraflufen và pyraflufen-etyl); các oxadiazol (như oxadiargyl và oxadiazon); các triazolinon (như azafenidin, bencarbazon, carfentrazon, các este và muối của nó, và sulfentrazon); các oxazolidinedion (như pentoxazon); các N-phenylphtalimit (như cinidon-etyl, flumiclorac, flumiclorac-pentyl, và flumioxazin); các dẫn xuất benzoxazinon (như 1,5-dimetyl-6-thioxo-3-(2,2,7-triflo-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2*H*-1,4-benzoxazin-6-yl)-1,3,5-triazinan-2,4-dion); flufenpyr và flufenpyr-etyl; pyraclonil; và profluaazol.

Việc áp dụng các chất diệt cỏ có thể là theo một cách liên tiếp hoặc được trộn bằng thùng với một, hai chất diệt cỏ hoặc một dạng kết hợp của một vài chất diệt cỏ hoặc chất diệt cỏ tương hợp bất kỳ khác. Nhiều lần áp dụng một chất diệt cỏ hoặc hai chất diệt cỏ trở lên, ở dạng kết hợp hoặc chỉ một mình, có thể được sử dụng trong mùa sinh trưởng cho các diện tích có các thực vật chuyển gen theo sáng chế dùng cho việc kiểm soát nhiều loại cỏ dại hai lá mầm, cỏ dại một lá mầm, hoặc cả hai, ví dụ, hai lần áp dụng (như áp dụng trước khi trồng và áp dụng sau khi mọc hoặc áp dụng trước khi mọc và áp dụng sau khi mọc) hoặc ba lần áp dụng (như áp dụng trước khi trồng, áp dụng trước khi mọc, và áp dụng sau khi mọc hoặc áp dụng trước khi mọc và hai lần áp dụng sau khi mọc).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “khả năng chống chịu” hoặc “khả năng chống chịu chất diệt cỏ” có nghĩa là khả năng của thực vật, hạt giống, hoặc tế bào trong việc kháng lại các tác dụng độc của chất diệt cỏ khi được áp dụng. Khả năng chống chịu chất diệt cỏ của thực vật, hạt giống, mô thực vật, bộ phận của thực vật, hoặc tế bào có thể được đo bằng cách so sánh thực vật, hạt giống, mô thực vật, bộ phận của thực vật, hoặc tế bào với một đối chứng thử nghiệm thích hợp. Ví dụ, khả năng chống chịu chất diệt cỏ có thể được đo hoặc đánh giá bằng cách áp dụng chất diệt cỏ cho thực vật chứa phân tử ADN

tái tổ hợp mã hóa protein có khả năng đem lại khả năng chống chịu chất diệt cỏ (thực vật kiểm tra) và thực vật thuộc cùng một loài không chứa phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa protein có khả năng đem lại khả năng chống chịu chất diệt cỏ (thực vật đối chứng âm) và sau đó, so sánh tổn thương thực vật của hai thực vật này, trong đó khả năng chống chịu chất diệt cỏ của thực vật kiểm tra được thể hiện bằng tỷ lệ tổn thương giảm so với tỷ lệ tổn thương của thực vật đối chứng âm. Hạt giống, mô thực vật, bộ phận của thực vật, tế bào hoặc thực vật chống chịu chất diệt cỏ biểu hiện một mức đáp ứng giảm đối với các tác dụng độc của chất diệt cỏ khi so với hạt giống, mô thực vật, bộ phận của thực vật, tế bào hoặc thực vật đối chứng âm. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “tính trạng chống chịu chất diệt cỏ” là tính trạng chuyển gen truyền khả năng chống chịu chất diệt cỏ được cải thiện vào thực vật so với thực vật đối chứng âm.

Các loài thực vật, thể hệ con, hạt giống, tế bào thực vật, và bộ phận của thực vật chuyển gen theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều tính trạng chuyển gen phụ thêm. Các tính trạng chuyển gen phụ thêm có thể được đưa vào bằng cách lai thực vật chứa gen được chuyển bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp được đề xuất theo sáng chế với một thực vật khác chứa (các) tính trạng chuyển gen phụ thêm. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “lai” có nghĩa là nhân giống hai thực vật riêng biệt để tạo ra thực vật thể hệ con. Có thể lai hai thực vật chuyển gen như vậy để tạo ra thể hệ con mà chứa các tính trạng chuyển gen. Như được sử dụng trong bản mô tả này “thể hệ con” có nghĩa là con thuộc thể hệ bất kỳ của thực vật bố mẹ, và thể hệ con chuyển gen chứa cấu trúc ADN được đề xuất theo sáng chế và kế thừa từ ít nhất một thực vật bố mẹ. Theo cách khác, (các) tính trạng chuyển gen phụ thêm có thể được đưa vào bằng cách biến nạp cấu trúc ADN đối với (các) tính trạng chuyển gen phụ thêm đó bằng cấu trúc ADN bao gồm các phân tử ADN tái tổ hợp được đề xuất theo sáng chế (ví dụ, bằng tất cả các cấu trúc ADN có mặt trong vai trò là một phần của cùng một vật truyền được sử dụng cho quá trình biến nạp thực vật) hoặc bằng cách chèn (các) tính trạng phụ thêm vào thực vật chuyển gen bao gồm cấu trúc ADN được đề xuất theo sáng chế hoặc ngược lại (ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp của quá trình biến nạp thực vật trên tế bào thực vật hoặc thực vật chuyển gen). Các tính trạng chuyển gen phụ thêm như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng kháng côn trùng tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, hiệu suất sản lượng tăng, khả năng kháng khô hạn tăng, chất lượng hạt giống tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện, khả năng sản xuất hạt giống lai, và khả năng chống chịu chất diệt cỏ, mà trong

đó tính trạng này được đo so với thực vật loại hoang dại. Các tính trạng chuyển gen phụ thêm như vậy là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, danh sách của các tính trạng như vậy được đưa ra bởi Cục Kiểm dịch Động Thực vật (APHIS) trực thuộc Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA).

Các thực vật và thể hệ con chuyển gen mà chứa tính trạng chuyển gen được đề xuất theo sáng chế có thể được sử dụng với các phương pháp nhân giống bất kỳ mà thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ở các dòng thực vật bao gồm hai tính trạng chuyển gen trở lên, các tính trạng chuyển gen này có thể phân tách một cách độc lập, được liên kết, hoặc là dạng kết hợp của cả hai ở các dòng thực vật có ba tính trạng chuyển gen trở lên. Quá trình lai ngược trở lại với thực vật bố mẹ và lai ngoài chủng với thực vật không chuyển gen cũng được dự liệu, như là nhân giống sinh dưỡng. Các phân mô tả về các phương pháp nhân giống mà thường được sử dụng để có được các tính trạng và cây trồng khác nhau là đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để xác nhận sự có mặt của (các) gen được chuyển ở một hạt giống hoặc thực vật cụ thể, một loạt thử nghiệm có thể được thực hiện. Các thử nghiệm như vậy bao gồm, ví dụ, các thử nghiệm sinh học phân tử, như thấm tách phương Nam và thấm tách phương Bắc, PCR, và phương pháp giải trình tự ADN; các thử nghiệm sinh hóa, như phát hiện sự có mặt của sản phẩm protein, ví dụ, bằng phương tiện miễn dịch học (ELISA và thấm tách phương Tây) hoặc bằng chức năng enzym; các thử nghiệm về bộ phận của thực vật, như thử nghiệm về lá hoặc thử nghiệm về rễ; và đồng thời, bằng cách phân tích kiểu hình của thực vật nguyên cây. Để phân tích quá trình chế biến CTP ở một hạt giống hoặc thực vật chuyển gen cụ thể, các thử nghiệm như phương pháp giải trình tự bằng quá trình suy biến của Edman hoặc phép phân tích đo phổ khối có thể được thực hiện trên protein PPO hoặc DMO tái tổ hợp thu được từ thực vật, hạt giống hoặc tế bào chuyển gen và dữ liệu trình tự thu được lần lượt so với dữ liệu trình tự của protein PPO hoặc DMO.

Quá trình nhập gen của tính trạng chuyển gen vào kiểu gen thực vật là đạt được do quá trình chuyển hóa lai ngược trở lại. Kiểu gen thực vật mà tính trạng chuyển gen đã được nhập gen vào đó có thể được gọi là dòng, vật lai cùng dòng, vật lai hoặc kiểu gen được chuyển hóa nhờ lai ngược trở lại. Theo cách tương tự, kiểu gen thực vật thiếu tính trạng chuyển gen mong muốn có thể được gọi là dòng, vật lai cùng dòng, vật lai hoặc kiểu gen không được chuyển hóa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bao gồm” có nghĩa là “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở”.

Các ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được lấy vào để chứng minh các phương án của sáng chế. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải nhìn nhận rằng, vì xem xét đến sáng chế này, có thể tạo ra nhiều thay đổi ở các phương án cụ thể mà được đề xuất và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không đi trệch khỏi phạm vi và phạm vi khái niệm của sáng chế. Cụ thể hơn là, sẽ sáng tỏ rằng các chất nhất định mà có liên quan về mặt hóa học hoặc sinh lý có thể được sử dụng để thay thế cho các chất được mô tả trong bản mô tả này có cùng một kết quả hoặc đạt được kết quả tương tự. Tất cả các dạng thay thế và dạng cải biến tương tự như vậy sáng tỏ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này được xem là trong phạm vi và khái niệm của sáng chế.

Ví dụ 1: Quá trình biểu hiện CTP-DMO và quá trình định vị ở các thể nguyên sinh đậu tương

Thử nghiệm về thể nguyên sinh đậu tương được sử dụng để đánh giá hiệu quả hướng đích lục lap tương đối của protein tái tổ hợp bao gồm một trong số năm CTP được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự DMO (SEQ ID NO:27). Để theo dõi mức phân bố chất dịch bào tương và lục lap của protein tái tổ hợp, trình tự mã hóa protein huỳnh quang xanh lục được bổ sung vào kết cấu mã hóa dạng kết hợp DMO và CTP tái tổ hợp (được gọi trong bản mô tả này là CTP-DMO) sao cho protein huỳnh quang xanh lục được dung hợp vào đầu mút đầu tận cùng carboxy của DMO.

Các thể nguyên sinh được điều chế từ lá mầm đậu (chất mầm nguyên sinh A3244). Quả đậu tương chưa trưởng thành được thu hoạch và các hạt giống (dài 4-6mm) được lấy ra bằng cách sử dụng kỹ thuật vô trùng. Lá mầm từ mỗi hạt giống được lấy ra bằng tay, được thái theo chiều nằm ngang thành miếng 1mm, và được ủ trong dung dịch đệm CPW (độ pH 5,8) với manitol 0,7M trong 1 giờ ở 24-26°C trong bóng tối trong khi lắc ở mức 40 vòng/phút. Sau đó, dung dịch đệm này được loại ra và được thay thế bằng dung dịch đệm enzyme (Xenlulaza ‘onozuka’ R-10 4%; Hemixenlulaza 2%; Macerozyme R-10 0,3%; trong dung dịch đệm CPW (độ pH 5,8; với manitol 0,49M). Mô lá mầm được ủ trên thiết bị lắc quay ở mức 50 vòng/phút ở 24-26°C trong 2 giờ. Các thể nguyên sinh đậu tương được giải phóng khỏi mô lá mầm vào lúc kết thúc quá trình ủ này bằng cách lắc xoáy đĩa bằng tay và

lọc huyền phù thông qua lớp kép của mắt lưới nylon 60um vào ống hình nón 50ml. Các thể nguyên sinh được rửa một cách nhẹ nhàng một lần bằng quá trình tái tạo huyền phù và ly tâm. Viên kết cuối cùng được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm (MES 4mM, độ pH 5,7; NaCl 150mM; CaCl₂ 5mM; Manitol 0,5M) và được để yên trong 1 giờ trên nước đá. Sau đó, các thể nguyên sinh được ly tâm và viên kết được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm biến nạp (Manitol 0,4M; MgCl₂ 15mM; MES 4mM, độ pH 5,7). Thể tích này được điều chỉnh để cho phép có $1 \times 10.000.000$ thể nguyên sinh/ml. Quá trình biến nạp được thực hiện bằng cách trộn 12,5µg ADN đối với mỗi cấu trúc. ADN này được kết hợp một cách nhẹ nhàng với $1,5 \times 1.000.000$ thể nguyên sinh, sau đó là quá trình bổ sung một thể tích ngang bằng của dung dịch đệm PEG. Phần này được ủ trong 5 phút, sau đó, được pha loãng một cách chậm rãi bằng 300µl dung dịch đệm W5 (NaCl 154mM; CaCl₂ 125mM; KCl 5mM; MES 2mM, độ pH 5,7). Phần này được ủ 5 - 10 phút và sau đó, 900µl dung dịch đệm W5 được bổ sung một cách chậm rãi. Các thể nguyên sinh được tạo viên kết và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm WI (Manitol 0,5M; MES 4mM (độ pH 5,7); KCl 20mM) và được ủ ở 24-26°C trong bóng tối. Phép phân tích bằng phương pháp soi kính hiển vi được thực hiện bằng cách sử dụng Kính hiển vi Quét Laze Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY) được trang bị laze Krypton-Argon Ion (458, 488nm), laze Heli-Neon xanh lục (543nm), và các bộ lọc phẩm đỏ Texas và FITC. Quá trình thu nhập hình ảnh và phép phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng ZEN 2012 v.8.1 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Thornwood, NY) và vật kính ngâm nước khẩu độ số 1,2 phóng đại 40X. Các bước sóng kích thích được sử dụng là 488nm (GFP) và 543nm (sự tự phát huỳnh quang từ lục lạp), và các bộ lọc phát xạ là 500-530nm (GFP) và 630-700nm (sự tự phát huỳnh quang từ lục lạp). Đối với mỗi cấu trúc, ít nhất 50 tế bào riêng biệt được tính điểm cho quá trình định vị cấu trúc: chất dịch bào tương, lạp thể, hoặc cả hai chất dịch bào tương và lạp thể. Kết quả được ghi lại ở dạng tỷ lệ phần trăm của các tế bào có protein được định vị trong chất dịch bào tương hoặc lạp thể (hoặc cả hai) của tổng số của các tế bào được phân tích và được đưa ra trong Bảng 4.

Bảng 4. Thử nghiệm hướng đích thể nguyên sinh đậu tương

CTP	Tổng số tế bào được tính điểm	Chất dịch bào tương	Chất dịch bào tương và lập thể	Lập thể
APG6 (SEQ ID NO:1)	58	0	0	100%
At.CR88 (SEQ ID NO:3)	53	0	6%	94%
A	53	0	21%	79%
B	54	0	91%	9%
C	56	0	82%	18%
không có	55	100%	0	0

Trong số năm dạng kết hợp CTP-DMO được phân tích, chỉ có CTP APG6 (SEQ ID NO:1) đã đem lại 100% số tế bào thể hiện quá trình định vị protein chỉ vào lập thể. CTP At.CR88 (SEQ ID NO:3) đã đem lại 94% số tế bào thể hiện quá trình định vị protein chỉ vào lập thể và 6% số tế bào thể hiện quá trình định vị protein vào chất dịch bào tương và lập thể. CTP ‘A’ đã đem lại 79% số tế bào thể hiện quá trình định vị protein chỉ vào các lập thể và 21% số tế bào thể hiện quá trình định vị vào chất dịch bào tương và lập thể. CTP ‘B’ đã đem lại 9% số tế bào thể hiện quá trình định vị protein chỉ vào lập thể và 91% số tế bào thể hiện quá trình định vị vào các lập thể và chất dịch bào tương. CTP ‘C’ đã đem lại 18% số tế bào thể hiện quá trình định vị protein chỉ vào lập thể và 82% số tế bào thể hiện quá trình định vị vào các lập thể và chất dịch bào tương. Nếu không có CTP, thì protein có mặt chỉ trong chất dịch bào tương. Các kết quả này thể hiện rằng CTP APG6 là có hiệu quả 100% đối với việc hướng đích CTP-DMO đến các lập thể và CTP At.CR88 là có hiệu quả 94% đối với việc hướng đích CTP-DMO đến các lập thể.

Ví dụ 2: Quá trình chế biến CTP-DMO ở lúa mì chuyển gen

Cây lúa mì chuyển gen được biến nạp bằng cấu trúc ADN bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa một trong số bốn CTP tách biệt được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO được sử dụng để đánh giá quá trình biểu hiện protein và để xác định quá trình chế biến CTP.

Cây lúa mì chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng bốn vật truyền biến nạp thực vật khác nhau mà mỗi vật truyền này bao gồm cấu trúc ADN chứa một trong số bốn CTP

khác nhau được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào gen khởi đầu. Các phôi thai chưa trưởng thành được nuôi cấy trước từ chất mầm nguyên sinh lúa mì Samson (PVP 1994) được biến nạp bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* để tạo ra các thực vật con chuyển gen bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các mẫu lá được lấy cho phép phân tích phân tử để xác nhận số bản sao gen được chuyển trong hệ gen của mỗi sự biến đổi nhất, và thực vật R0 có một bản sao của gen được chuyển được tự lai tạo và hạt giống R1 được thu gom.

Hạt giống (50g) được xay thành bột, sau đó, phần này được bổ sung vào dung dịch đệm chiết 250ml (1xTBE (Tris-borat 89mM, EDTA 2mM, độ pH 8,4), NaCl 200mM, glycerin 10%, phenylmethylsulfonyl florua 1mM (PMSF), benzamidin 5mM, dithiothreitol (DTT) 2mM, các chất ức chế proteaza cOmplete™ (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)), và được làm thuần nhất bằng Polytron® (VWR, Radnor, PA) trong khoảng chừng 20 giây, sau đó, được ủ trong khi vẫn lắc ở mức 4°C trong 1 đến 2 giờ. Hỗn hợp được ly tâm ở 4°C trong 25 phút ở mức 9.000 vòng/phút và dịch nổi ở trên được kết tủa một cách liên tiếp bằng amoni sulfat (AS) bão hòa 10% và 55%, mà mỗi bước kết tủa được ly tâm ở 18.000 vòng/phút trong 20 phút. Viên kết từ dạng kết tủa AS 10% được vớt bỏ.

Viên kết từ phần 10-55% được hòa tan trong 30ml PBS (natri phosphat 0,1M, NaCl 0,15M) với 1 viên nén của các chất ức chế proteaza cOmplete™. Viên kết đã được hòa tan được ly tâm và dịch nổi ở trên được lọc thông qua màng 0,22µm. Huyết thanh kháng thể đa dòng của dê chống lại DMO được trộn với huyền phù có tỷ lệ 1:1 của nhựa Pierce™ protein A/G agarosa (ThermoFischer Scientific, Grand Island, NY), sau 1,5 giờ, nhựa protein A/G agarosa được nạp kháng thể kháng DMO được rửa 3 lần bằng PBS và được bổ sung vào khoảng chừng 30ml của phần được lọc bằng AS 10% - 55%. Sau khi ủ, nhựa được quay và được rửa 3 lần bằng PBS, sau đó, được tái tạo huyền phù trong 1ml PBS và được chuyển sang ống vi ly tâm và được tạo viên kết lần nữa.

Viên kết cuối cùng được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm Laemmli 2X, được đun sôi trong 5 phút, và các mẫu được chạy trên gel SDS-PAGE 10% trong dung dịch đệm Tris-glyxin ở 185V (không đổi). Các protein trong gel SDS-PAGE được chuyển sang màng PVDF bằng cách sử dụng dung dịch đệm chuyển CAPS, trong 30 phút ở 4°C và 100V. Các protein đã liên kết vào màng PDVF được nhuộm bằng phẩm xanh lam Coomassie trong

xấp xỉ 30 giây và bằng tương ứng với mỗi protein trong số các protein DMO trong phần AS 10% - 55% được cắt bỏ khỏi màng thấm tách PVDF và được sử dụng cho phép phân tích trình tự protein đầu tận cùng amin. Phương pháp giải trình tự protein đầu tận cùng amin được thực hiện bằng hóa học về quá trình suy biến Edman được tự động hóa, mà mỗi phép phân tích được thực hiện trong 15 chu kỳ bằng cách sử dụng hóa học về quá trình suy biến Edman được tự động hóa. Hệ thống Giải trình tự Applied Biosystems 494 Procise® có bơm 140C Microgradient và Thiết bị phát hiện Perkin Elmer Series 200 UV/Vis được sử dụng cho phép phân tích được kiểm soát bằng phần mềm Procise Control (phiên bản 2.1) (ThermoFischer Scientific, Grand Island, NY). Dữ liệu sắc ký được thu gom bằng cách sử dụng phần mềm phân tích giải trình tự protein SequencePro® (phiên bản 2.1). Độ đồng nhất được thiết lập cho mỗi protein nếu ít nhất 8 axit amin nhất quán với trình tự được dự đoán của protein được dự kiến được quan sát. Các kết quả của phép giải trình tự đầu tận cùng amin được trình bày trong Bảng 5.

Bảng 5. Phép giải trình tự đầu tận cùng amin của protein tái tổ hợp

Các sự biến được kiểm tra	CTP	DMO	Quá trình chế biến CTP-DMO
2	APG6 (SEQ ID NO:1)	DMO (SEQ ID NO:18)	DMO+1
3	At.CR88 (SEQ ID NO:3)	DMO (SEQ ID NO:18)	DMO và DMO+1
1	CTP4 (SEQ ID NO:4)	DMO (SEQ ID NO:19)	DMO+12
2	Os.waxy (SEQ ID NO:6)	DMO (SEQ ID NO:18)	DMO+10 và DMO-1

Các tên gọi của DMO, DMO+1, DMO+10, và DMO+12 được sử dụng để thể hiện rằng phép giải trình tự protein thể hiện rằng đã có lần lượt 0, 1, 10, hoặc 12 axit amin của CTP còn lại trên đầu mút đầu tận cùng amin của DMO sau khi chế biến. Tên gọi của DMO-1 được sử dụng để thể hiện rằng metionin thứ nhất của DMO được loại ra sau quá trình chế biến. Hai sự biến độc nhất được kiểm tra về CTP APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo

kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Cả hai mẫu đã thể hiện một axit amin của CTP còn lại trên đầu mút đầu tận cùng amin của DMO sau quá trình chế biến (DMO+1). Ba sự biến độc nhất được kiểm tra về CTP At.CR88 (SEQ ID NO:3) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Tất cả ba mẫu đã thể hiện không hoặc một axit amin của CTP còn lại trên đầu mút đầu tận cùng amin của DMO sau quá trình chế biến (DMO và DMO+1). Sự biến được kiểm tra từ CTP4 (SEQ ID NO:4) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:19) đã thể hiện mười hai axit amin của CTP còn lại trên đầu mút đầu tận cùng amin của DMO sau quá trình chế biến (DMO+12). Hai sự biến độc nhất được kiểm tra về CTP Os.Waxy (SEQ ID NO:6) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Một mẫu đã thể hiện mười axit amin của CTP còn lại trên đầu mút đầu tận cùng amin của DMO sau quá trình chế biến (DMO+10) và một đã thể hiện metionin thứ nhất của DMO được loại ra sau quá trình chế biến (DMO-1). Các kết quả này thể hiện rằng CTP APG6 và CTP At.CR88 được chế biến một cách có hiệu quả từ DMO khi được biểu hiện ở các thực vật chuyển gen.

Ví dụ 3: Quá trình biểu hiện CTP-DMO ở *Brassica napus* chuyển gen

Khả năng của các cấu trúc ADN bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa một trong số ba CTP tách biệt được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO trong việc đem lại khả năng chống chịu dicamba được đánh giá bằng thực vật *Brassica napus* chuyển gen.

Thực vật *Brassica napus* chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng ba vật truyền biến nạp thực vật khác nhau mà mỗi vật truyền này bao gồm cấu trúc ADN chứa một trong số ba CTP khác nhau được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào gen khởi đầu. Giống *Brassica napus* dòng Phục hồi 65037 được sử dụng cho quá trình biến nạp do *Agrobacterium* làm trung gian và thực vật R0 được sinh trưởng trong nhà kính. Sự biến độc nhất được sàng lọc về số bản sao của gen được chuyển. Thực vật R0 có một bản sao của gen được chuyển được tự lai tạo và hạt giống R1 được thu gom.

Khả năng chống chịu dicamba được đánh giá bằng cách sử dụng thực vật R0 có một bản sao của gen được chuyển có khung chính vật truyền hoặc hai bản sao của gen được chuyển. Khả năng chống chịu dicamba được chỉ định là tổn thương do dicamba là 20% trở xuống trong các điều kiện nhà kính. Các sự biến R0 ở các chậu được chia thành ba nhóm

và dicamba (Clarity®) được áp dụng ở một trong số ba tỷ lệ: (1) không có dicamba, (2) dicamba ở mức 1lb ae/mẫu Anh (tỷ lệ 2X), hoặc (3) dicamba ở mức 2lb ae/mẫu Anh (tỷ lệ 4X). Các thực vật chuyển gen được phun và các mức xếp hạng tổn thương được ghi lại 21 ngày sau. Thực vật chứa CTP “A” được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:21) đã không thể hiện sự biến nào có tính chống chịu đối với dicamba. Thực vật chứa CTP RbcS (SEQ ID NO:5) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:21) đã thể hiện 8 trong số 9 sự biến có khả năng chống chịu đối với tỷ lệ 2X của dicamba và 7 trong số 7 sự biến có khả năng chống chịu đối với tỷ lệ 4X của dicamba. Thực vật chứa CTP APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:20) đã thể hiện 7 trong số 14 sự biến có khả năng chống chịu đối với tỷ lệ 2X của dicamba và 6 trong số 18 sự biến có khả năng chống chịu đối với tỷ lệ 4X của dicamba. Các kết quả được đưa ra trong Bảng 6.

Bảng 6. Khả năng chống chịu dicamba ở *Brassica napus* R0

CTP	DMO	Các sự biến có tính chống chịu 2X	Các sự biến có tính chống chịu 4X
APG6 (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:20	7/14	6/18
RbcS (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO:21	8 /9	7/7
A (Cấu trúc 7)	SEQ ID NO:21	0	0

Khả năng chống chịu dicamba được đánh giá trên thực vật R0 có một bản sao của gen được chuyển. Thực vật được phun trong nhà kính bằng dicamba (Clarity) ở mức 1lb ae/mẫu Anh (tỷ lệ 2X), và khả năng chống chịu dicamba được xác định 14 đến 21 ngày sau. Thực vật chứa CTP APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:20) đã thể hiện 13 sự biến trong số 31 sự biến có khả năng chống chịu đối với dicamba. Thực vật chứa CTP RbcS được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:21) đã thể hiện 13 sự biến trong số 17 sự biến có khả năng chống chịu đối với dicamba. Thực vật chứa CTP “A” được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:21) đã thể hiện 7 sự biến trong số 18 sự biến có khả năng chống chịu đối với dicamba. Các kết quả được đưa ra trong Bảng 7.

Bảng 7. Khả năng chống chịu dicamba ở *Brassica napus* R0

CTP	DMO	Các sự biến có tính chống chịu 2X
APG6 (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:20	13/31
RbcS (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO:21	13/17
A (Cấu trúc 7)	SEQ ID NO:21	7/18

Mười hạt giống từ mỗi thực vật trong số 28 thực vật R1 chứa CTP APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:20) (APG6+DMO) và mười hạt giống từ mỗi thực vật trong số 17 thực vật R1 chứa CTP RbcS được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:21) (RbcS+DMO) được sinh trưởng trong nhà kính. Thực vật được phun bằng dicamba ở mức 2lb ae/mẫu Anh (4X) vào ngày trồng, sau đó là dicamba ở mức 1lb ae/mẫu Anh (2X) dicamba ở giai đoạn V3, và dicamba ở mức 1lb ae/mẫu Anh (2X) dicamba ở giai đoạn có hoa đầu tiên (được định nghĩa là >90% số thực vật có đơm hoa và khoảng chừng 25% có ít nhất một hoa nở). Các mức xếp hạng tổn thương được lấy bảy ngày sau mỗi lần phun và được biểu đạt ở dạng phần trăm tổn thương so với các đối chứng được phun. Đối với thực vật chứa APG6+DMO, đã có tổng cộng 9 thể hệ con từ 2 sự biến có các mức xếp hạng tổn thương do dicamba là $\leq 20\%$ ở mỗi khoảng thời gian trong số ba khoảng thời gian xếp hạng. Đối với thực vật chứa RbcS+DMO, đã có 77 thực vật xuyên suốt 16 sự biến có khả năng chống chịu dicamba là nhỏ hơn 20% ở mỗi khoảng thời gian trong số ba khoảng thời gian xếp hạng.

Quá trình xác định đặc điểm protein được thực hiện bằng cách sử dụng các lá được thu hoạch từ các sự biến R0. Mô lá được xay trong nitor lỏng và được chiết bằng hai phần thể tích của dung dịch đệm Laemmli 2X (BioRad, Hercules, CA) chứa 2-mercaptoetanol 10% và DTT 5mM. Các mẫu được đun sôi và 10 μ l được nạp lên trên gel được đúc trước 4-20% Criterion™ (BioRad, Hercules, CA) và được chạy trong dung dịch đệm Tris/glyxin/SDS ở 250V trong 45 phút. Protein trong gel được chuyển sang màng PVDF ở 400mA trong 30 phút trong dung dịch đệm Tris/glyxin chứa metanol 20%. Protein DMO được phát hiện bằng cách sử dụng huyết thanh miễn dịch kháng DMO đa dòng của thỏ và kháng thể thứ cấp kháng của thỏ được tiếp hợp với HRP. Tín hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent (ThermoFischer Scientific,

Grand Island, NY). Đã có một băng đơn lẻ là xấp xỉ 38kDa, đây là kích cỡ được dự kiến của protein DMO được chế biến một cách hoàn chỉnh, đối với mỗi sự biến trong số ba sự biến chứa APG6-DMO. Đã có hai băng là xấp xỉ 38kDa và xấp xỉ 41kDa đối với mỗi sự biến trong số sáu sự biến chứa RbcS-DMO. Băng 41kDa là nhất quán với DMO+27 và đã được ghi nhận ở đậu tương chứa RbcS-DMO trước đó (U.S. Patent No. 7,838,729). Đã có mức biểu hiện rất thấp của protein DMO ở tất cả các sự biến chứa DMO-CTP “A”, và tín hiệu được phát hiện sau khoảng thời gian tiếp xúc dài là bằng bằng xấp xỉ 50kDa và bằng bằng xấp xỉ 39kDa. Băng 50kDa là xấp xỉ kích cỡ được dự kiến của DMO-CTP “A” không được chế biến. Các kết quả này thể hiện rằng APG6-DMO đã tạo ra một băng đơn lẻ có kích cỡ được dự kiến nhất quán với DMO được chế biến một cách đầy đủ.

Protein tái tổ hợp được tinh chế từ mô lá của thực vật R0 chứa APG6-DMO hoặc RbcS-DMO. Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin được thực hiện bằng cách sử dụng hóa học về quá trình suy biến của Edman như được mô tả. Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin đã xác nhận các trình tự đầu tận cùng amin DMO có mặt của DMO+27 và DMO-1 có mặt ở thực vật chứa RbcS-DMO, nhất quán với kích cỡ của các băng DMO được nhìn thấy trên màng thấm tách phương Tây. Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin đã xác nhận sự có mặt của chỉ DMO+1 trình tự đầu tận cùng amin DMO ở thực vật chứa APG6-DMO, nhất quán với kích cỡ của các băng DMO được nhìn thấy trên màng thấm tách phương Tây. Kết quả này xác nhận rằng việc sử dụng CTP APG6 đem lại quá trình chế biến hoàn chỉnh của DMO được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được ở thực vật.

Ví dụ 4: Quá trình biểu hiện CTP-DMO ở ngô chuyển gen

Quá trình biểu hiện của các cấu trúc ADN bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa một trong số hai CTP tách biệt được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO được phân tích ở thực vật và tế bào ngô chuyển gen.

Quá trình biến nạp nhất thời thể nguyên sinh lớp diệp nhục ngô được sử dụng để đánh giá mức biểu hiện DMO tương đối của hai dạng kết hợp CTP-DMO. Các cấu trúc ADN là đồng nhất chỉ có điều CTP được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18) là APG6 (SEQ ID NO:1) hoặc CTP4 (SEQ ID NO:4). Các thể nguyên sinh được điều chế về cơ bản như được mô tả trong Ví dụ 1. Sau quá trình biến nạp, các tế bào được thu hoạch và các mức protein DMO được xác định bằng thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA). Protein từ bốn mẫu thể nguyên sinh được biến

nạp được đo đối với mỗi dạng kết hợp CTP-DMO ở dạng nanogram (ng) DMO cho mỗi miligram (mg) tổng protein. Các thể nguyên sinh được biến nạp bằng APG6-DMO đã có mức DMO cao hơn xấp xỉ 4 lần so với các thể nguyên sinh được biến nạp bằng CTP4-DMO. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 8.

Cây ngô chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng các cấu trúc ADN, và thực vật R0 được sinh trưởng. Các mẫu lá được thu gom từ thực vật R0 thể hiện tám sự biến bản sao đơn lẻ độc nhất và sử dụng cho ELISA định lượng để đo mức DMO. Mức biểu hiện DMO ở mô lá R0 đối với các sự biến chứa APG6-DMO là cao hơn xấp xỉ 4 lần so với các sự biến chứa CTP4-DMO. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 8.

Phép giải trình tự đầu tận cùng amin được thực hiện đối với DMO được biểu hiện ở cây ngô chuyển gen. Protein được tinh chế từ cây ngô chuyển gen biểu hiện CTP4-DMO hoặc APG6-DMO và được điều chế cho phương pháp giải trình tự bằng quá trình suy biến của Edman về cơ bản như được mô tả trong Ví dụ 2. Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin đã xác nhận các trình tự đầu tận cùng amin DMO của DMO+6, DMO+7, và DMO+12 có mặt ở thực vật chứa CTP4-DMO. Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin đã xác nhận các trình tự đầu tận cùng amin DMO của DMO và DMO+1 ở thực vật chứa APG6-DMO. Các kết quả này thể hiện rằng quá trình chế biến CTP thì hoàn chỉnh hơn với APG6 so với CTP4, như được minh chứng bằng hiện tượng có ít axit amin CTP hơn còn lại ở đầu mút đầu tận cùng amin của DMO. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 8.

Bảng 8. Mức biểu hiện protein DMO ở ngô

CTP	Mức DMO thể nguyên sinh (ng/mg) (SD)	Mức DMO thực vật R0(ng/mg) (SD)	Quá trình chế biến CTP-DMO
APG6 (SEQ ID NO:1)	12,44 (1,91)	5,44 (0,82)	DMO và DMO+1
CTP4 (SEQ ID NO:4)	3,10 (0,64)	1,19 (0,55)	DMO+12, DMO+7, và DMO+6

Ngô chuyển gen được tạo ra bằng quá trình biến nạp do *Agrobacterium* làm trung gian bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có cấu trúc ADN chứa phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa APG6-DMO hoặc CTP4-DMO. Khả năng chống chịu dicamba được đánh giá trong thử nghiệm thực địa đối với thực vật

lai F1 chuyển gen. Thử nghiệm thực địa bao gồm bốn lần xử lý ở hai địa điểm mà mỗi lần có hai lần lặp lại như nhau. Bốn lần xử lý là: (1) dicamba (Clarity®) được áp dụng ở mức 2lb ae/mẫu Anh (4X) ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8; (2) dicamba được áp dụng ở mức 4lb at/mẫu Anh (8X) ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8; (3) dicamba được áp dụng ở mức 8lb at/mẫu Anh (16X) ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8; và (4) dicamba được áp dụng ở mức 16lb at/mẫu Anh (32X) ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8. Tổn thương cây trồng được xếp hạng mười ngày sau khi xử lý và được đo ở dạng phần trăm tổn thương cây trồng cho mỗi giai đoạn V (CIPV2, CIPV4, hoặc CIPV8). Vào lúc kết thúc mùa, hạt ngũ cốc được thu hoạch và sản lượng được đo ở dạng gia/mẫu Anh. Đối với cả mức xếp hạng CIPV và sản lượng, mức chênh lệch đáng kể ít nhất (least significant difference-LSD) ở mức xác suất là 5% ($p=0,05$) được tính toán. Các tỷ lệ dicamba cao nhất (16X và 32X) được áp dụng cho thực vật lai F1 chứa APG6-DMO đã thể hiện tổn thương sinh dưỡng hơi ít hơn và sản lượng hạt ngũ cốc cao hơn so với thực vật chứa CTP4-DMO. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 9.

Bảng 9. Thực hiện kiểm tra thử nghiệm thực địa thực vật lai F1 về tổn thương do dicamba

và sản lượng

Dicamba	CTP-DMO	CIPV2 (LSD=0,05)	CIPV4 (LSD=0,05)	CIPV8 (LSD=0,05)	Sản lượng gĩa/mẫu Anh (LSD=0,05)
2lb	CTP4-DMO	0,75 (4,7)	0,75 (7,1)	4,25 (4,6)	239,13 (21,17)
	APG6-DMO	0,75 (4,7)	2 (7,1)	3 (4,6)	231,99 (21,17)
	Đối chứng âm	40,63 (4,7)	45 (7,1)	49,38 (4,6)	58,25 (21,17)
4lb	CTP4-DMO	2 (5,4)	1,25 (6,6)	7,5 (5,3)	232,87 (17,11)
	APG6-DMO	1,5 (5,4)	2 (6,6)	7,5 (5,3)	230,44 (17,11)
	Đối chứng âm	46,875 (5,4)	65 (6,6)	80 (5,3)	5,69 (17,11)
8lb	CTP4-DMO	2,5 (8,4)	4 (5,3)	15 (6,7)	206,63 (28,15)
	APG6-DMO	1,5 (8,4)	4 (5,3)	11,25 (6,7)	242,37 (28,15)
	Đối chứng âm	73,125 (8,4)	81,25 (5,3)	87,375 (6,7)	3,51 (28,15)
16lb	CTP4-DMO	6,25 (4,8)	8,75 (3,1)	16,25 (0)	199,8 (18,35)
	APG6-DMO	2 (4,8)	5,75(3,1)	17,5 (0)	212,34 (18,35)
	Đối chứng âm	82,5 (4,8)	90,625 (3,1)	99,5 (0)	5,03 (18,35)

Ví dụ 5: Quá trình biểu hiện CTP-DMO ở đậu tương và bông chuyển gen

CTP APG6 được tối ưu hóa để tăng cường tính hiệu quả dịch mã protein (quá trình tổng hợp protein) và làm tăng hiện tượng tích tụ protein. CTP APG6 đã được tối ưu hóa

(SEQ ID NO:2) có sự thay đổi axit amin từ threonin (T) sang serin (S) ở các vị trí 3 và 4 của CTP APG6 (SEQ ID NO:1). Các cấu trúc ADN được tạo ra để so sánh hai CTP, mỗi CTP này được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO ở đậu tương.

Cây đậu tương chuyển gen được tạo ra có hai cấu trúc ADN mà đồng nhất ngoại trừ CTP APG6. Cấu trúc ADN thứ nhất có APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Cấu trúc ADN thứ hai có APG6 được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Mỗi cấu trúc ADN được sử dụng để biến nạp đậu tương A3555 bằng các phương pháp biến nạp do *Agrobacterium* làm trung gian. Sau quá trình biến nạp, thực vật chuyển gen R0 chứa một bản sao đơn lẻ của gen được chuyển được nhận diện bằng thử nghiệm PCR. Thực vật R0 có bản sao đơn lẻ được sinh trưởng trong nhà kính, và hạt giống R1 được thu hoạch. Mười hạt giống R1 cho mỗi sự biến đổi với 4 sự biến đổi được tạo ra bằng cách sử dụng mỗi cấu trúc trong số hai cấu trúc ADN và hạt giống AG3555 được trồng để đánh giá khả năng chống chịu của cây trồng đối với phương pháp xử lý dicamba sau khi mọc trong các điều kiện sinh trưởng tiêu chuẩn ở nhà kính. Dicamba (Clarity) được áp dụng ở giai đoạn V4 ở mức 1120g ai/ha. Các mức xếp hạng tổn thương cây trồng được lấy 10 ngày sau khi xử lý. Các mẫu lá từ cây đậu tương có tính chống chịu dicamba được lấy cho các lần đo mức protein tái tổ hợp và phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin. Mức protein DMO được phát hiện bằng ELISA là $13,35 \pm 2,7\text{ng/mg}$ đối với cây đậu tương chuyển gen R1 có tính chống chịu dicamba có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Mức protein DMO được phát hiện bằng ELISA là $18,55 \pm 3,1\text{ng/mg}$ đối với cây đậu tương chuyển gen R1 có tính chống chịu dicamba có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 đã được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2). Không phát hiện được protein DMO nào ở mô lá đậu tương A3555 đối chứng âm. Mức xếp hạng tổn thương do dicamba của cây đậu tương chuyển gen R1 có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18) là 3,6%. Mức xếp hạng tổn thương do dicamba của cây đậu tương chuyển gen R1 có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 đã được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18) là 2,7%. Đậu tương A3555 đối chứng âm có mức xếp hạng tổn thương do dicamba là 99,8%. Các mẫu lá từ cây đậu tương chuyển gen R1 có tính chống chịu dicamba có một bản sao đơn lẻ được sử dụng cho phép giải trình tự đầu tận cùng amin (như được

mô tả trong các Ví dụ 2 và 4). Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin đã xác nhận rằng quá trình chế biến APG6-DMO và APG6-DMO được tối ưu hóa đã đem lại quá trình chế biến đầy đủ của CTP từ đầu tận cùng amin của protein DMO. Mức DMO, tổn thương do dicamba, và quá trình chế biến APG6-DMO thể hiện rằng cả APG6 và APG6 được tối ưu hóa khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO đem lại khả năng chống chịu đối với dicamba và cả hai CTP được chế biến một cách đầy đủ ở thực vật. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 10.

Bảng 10. Thực hiện kiểm tra nhà kính đối với đậu tương R1

CTP	Mức DMO lá (ng/mg)	Tổn thương do dicamba, Giai đoạn V4	Quá trình chế biến APG6- DMO
APG6 SEQ ID NO:1	13,35 ± 2,7	3,6%	DMO
APG6 được tối ưu hóa SEQ ID NO:2	18,55 ± 3,1	2,7%	DMO
A3555 đối chứng âm	Không được phát hiện	99,8%	không áp dụng được

Cây bông chuyển gen được tạo ra có hai cấu trúc ADN mà đồng nhất ngoại trừ CTP APG6. Cấu trúc ADN thứ nhất có APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Cấu trúc ADN thứ hai có CTP APG6 đã được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Mỗi cấu trúc ADN được biến nạp vào bông bằng quá trình biến nạp do *Agrobacterium* làm trung gian bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau quá trình biến nạp, các cây bông chuyển gen R0 chứa một bản sao đơn lẻ của gen được chuyển được nhận diện bằng thử nghiệm PCR, được sinh trưởng trong nhà kính, và hạt giống R1 được thu hoạch. Mười hạt giống R1 cho mỗi sự biến từ 10 sự biến đổi với mỗi cấu trúc và hạt giống từ bông DP393 được trồng để đánh giá khả năng chống chịu của cây trồng đối với quá trình áp dụng sau khi mọc của dicamba. Dicamba (Clarity) được áp dụng ở giai đoạn V4 ở mức 1120g ai/ha. Các mức xếp hạng phần trăm tổn thương cây trồng được lấy 9 ngày sau khi xử lý. Các mẫu lá từ cây bông có tính chống chịu được sử dụng cho việc đo mức protein và phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin của APG6-DMO hoặc APG6-DMO được tối ưu hóa. Mức protein DMO được phát hiện bằng ELISA là $176,2 \pm 103$ ng/mg đối với cây bông chuyển gen R1 có tính chống chịu dicamba có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18). Mức protein DMO được phát hiện bằng ELISA là $136,5 \pm 58,6$ ng/mg đối với cây bông chuyển gen R1 có tính chống chịu dicamba có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 đã được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2). Không phát hiện

được protein DMO nào ở mô lá bông DP393 đối chứng âm. Tổn thương do dicamba của cây bông chuyển gen R1 có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18) là 2,6%. Tổn thương do dicamba của các thực vật chuyển gen R1 có một bản sao đơn lẻ có CTP APG6 đã được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO (SEQ ID NO:18) là 2,2%. Tổn thương bông DP393 đối chứng âm là 85%. Các mẫu lá từ thực vật R1 có tính chống chịu dicamba có một bản sao đơn lẻ được sử dụng cho phép giải trình tự đầu tận cùng amin (như được mô tả trong các Ví dụ 2 và 4). Phép phân tích trình tự đầu tận cùng amin đã xác nhận rằng quá trình chế biến APG6-DMO và APG6-DMO được tối ưu hóa đã đem lại quá trình chế biến đầy đủ của CTP từ đầu tận cùng amin của protein DMO. Mức biểu hiện protein DMO, tổn thương do dicamba, và quá trình chế biến đầu tận cùng amin của APG6-DMO và APG6-DMO được tối ưu hóa thể hiện rằng cả APG6 và APG6 được tối ưu hóa khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào DMO đem lại khả năng chống chịu đối với dicamba và cả hai CTP được chế biến một cách đầy đủ ở thực vật. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 11.

Bảng 11. Thực hiện kiểm tra nhà kính đối với bông R1

CTP	Mức DMO lá (ng/mg)	Tổn thương do dicamba tính theo %, Giai đoạn V4	Quá trình chế biến APG6-DMO
APG6 (SEQ ID NO:1)	176,2 ± 103	2,6%	DMO
APG6 được tối ưu hóa (SEQ ID NO:2)	136,5 ± 58,6	2,2%	DMO
DP393 đối chứng âm	Không được phát hiện	85%	không áp dụng được

Ví dụ 6: Mức biểu hiện CTP-PPO ở ngô chuyển gen

Các PPO mới mà có tính chống chịu đối với các chất diệt cỏ PPO được nhận diện bằng cách sử dụng hệ thống sàng lọc vi khuẩn dùng cho chất diệt cỏ. Hệ thống sàng lọc này đã sử dụng thử nghiệm về sự sinh trưởng của chủng *E. coli* khuyết thiếu trong môi

trường chất lỏng LB có chất diệt cỏ PPO để nhận diện các PPO mà không nhạy cảm đối với chất diệt cỏ PPO.

Chủng *E. coli* khuyết thiếu được biến nạp bằng vật truyền biểu hiện vi khuẩn chứa hoạt tính PPO đã được xác nhận và được nuôi cấy trong môi trường chất lỏng LB. Dạng tinh thể đã được tinh chế của một trong số năm chất diệt cỏ PPO khác nhau (acifluorfen (1mM), flumioxazin (0,5mM), lactofen (0,5mM), fomesafen (1mM), và S-3100 (100µM), thể hiện ba phân nhóm hóa học PPO khác nhau, được bổ sung vào môi trường này. Các protein tái tổ hợp được biểu hiện và tốc độ sinh trưởng của *E. coli* được đo. Các đường cong về sự sinh trưởng (OD600) được đo đối với các biến thể khác nhau khi có mặt và thiếu vắng các chất diệt cỏ PPO ở các thời điểm được chọn lựa từ thời điểm không đến hai mươi bốn giờ. Sự sinh trưởng của chủng *E. coli* khuyết thiếu đã được biến nạp trong môi trường LB khi có mặt chất diệt cỏ PPO thể hiện rằng gen được sử dụng để biến nạp *E. coli* đã mã hóa protoporphyrinogen oxidaza không nhạy cảm với chất diệt cỏ (iPPO).

Mười PPO được đưa ra ở dạng SEQ ID NO:40-49 tất cả đều được phát hiện thấy là đem lại các tốc độ sinh trưởng bình thường cho chủng *E. coli* khuyết thiếu trong môi trường LB khi có mặt chất diệt cỏ PPO, thể hiện rằng các protein này là các protoporphyrinogen oxidaza không nhạy cảm với chất diệt cỏ (iPPO). Chủng *E. coli* khuyết thiếu biểu hiện WH_PPO (SEQ ID NO:60) là nhạy cảm đối với tất cả năm chất diệt cỏ PPO, xác nhận rằng thử nghiệm này có thể phân biệt giữa PPO nhạy cảm và PPO không nhạy cảm đối với mỗi chất diệt cỏ trong số các chất diệt cỏ này.

Bốn vật truyền biến nạp thực vật được tạo ra dùng để biểu hiện PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) *in planta*. Các cấu trúc biến nạp 1 và 11 có cùng một dạng kết hợp gen khởi đầu cộng với gen dẫn đầu cộng với vùng nội, cùng một trình tự 3'UTR, cùng một PPO H_N10 (SEQ ID NO:43), nhưng khác biệt về các trình tự CTP, và được sử dụng trong quá trình biến nạp đậu tương. Các cấu trúc biến nạp 6 và 16 có cùng một dạng kết hợp gen khởi đầu cộng với gen dẫn đầu cộng với vùng nội, cùng một trình tự 3'UTR, cùng một PPO H_N10 (SEQ ID NO:43), nhưng khác biệt về các trình tự CTP, và được sử dụng trong quá trình biến nạp ngô. Bảng 12 đưa ra dạng kết cấu của các cấu trúc biến nạp thực vật PPO H_N10.

Bảng 12. Dạng kết cấu cấu trúc có PPO H_N10

Cây trồng biến nạp	Cấu trúc	CTP	CTP SEQ ID NO
Đậu tương và Bông	1	APG6	SEQ ID NO:1
Đậu tương	11	12G088600TP	SEQ ID NO:38
Ngô	6	APG6	SEQ ID NO:1
	16	12G088600TP	SEQ ID NO:38

Các enzym PPO được biểu hiện ở cây ngô chuyển gen, và các thực vật chuyển gen được phân tích về khả năng chống chịu chất diệt cỏ PPO. Các vật truyền biến nạp thực vật được kiến tạo bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp mã hóa một trong số các enzym PPO được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:40-59. Trình tự ADN mã hóa enzym PPO có thể bao gồm ở đầu mút 5' một codon dùng cho metionin, thường được gọi là codon khởi đầu, hoặc codon này có thể được loại bỏ để tạo thuận lợi cho sự liên kết có thể hoạt động được của trình tự peptit vận chuyển lục lạp vào đầu mút 5' của trình tự mã hóa. Các ví dụ về trình tự protein enzym PPO chứa metionin ở đầu tận cùng amin được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:40-49. Các ví dụ về trình tự protein enzym PPO mà không có metionin ở đầu tận cùng amin được đưa ra ở dạng các SEQ ID NO:50-59. Đối với quá trình biến nạp thực vật, các trình tự nucleotit mã hóa các enzym PPO giả định được tối ưu hóa codon dùng cho quá trình biểu hiện thực vật hai lá mầm hoặc quá trình biểu hiện thực vật một lá mầm. Bảng 2 đưa ra các SEQ ID NO tương ứng với trình tự protein và trình tự nucleotit của các enzym PPO trong các vật truyền biến nạp.

Đối với việc thực hiện kiểm tra ở ngô *in planta*, ngô (LH244) được biến nạp bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* và các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thực vật F1 chuyển gen được tạo ra từ quá trình lai ngoài chủng thực vật R0 có bản sao đơn lẻ biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:43) ở một trong số hai dạng kết cấu cấu trúc được kiểm tra trong nhà kính về khả năng chống chịu chất diệt cỏ. Thực vật được xử lý bằng S-3100 ở mức 40 gam/ha ở giai đoạn sinh trưởng V3 và các mức xếp hạng tổn thương được lấy bảy ngày sau khi xử lý. Cây ngô chuyển gen biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:43) trong dạng kết cấu cấu trúc 6 (APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43)) đã đem lại 13 trong số 18 sự biến tạo ra thực vật có tính chống chịu cao (tổn thương 10% trở xuống) nhưng dạng kết cấu cấu trúc 16 (12G088600TP (SEQ ID NO:38) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được

vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43)) đã không đem lại sự biến tạo ra thực vật có tính chống chịu cao nào.

Thực vật F1 chuyển gen được tạo ra từ quá trình lai ngoài chủng thực vật R0 có bản sao đơn lẻ biểu hiện H_N10 (SEQ ID NO:43) ở một trong số hai dạng kết cấu cấu trúc (các cấu trúc 6 và 16) được kiểm tra ở thực địa về khả năng chống chịu chất diệt cỏ. Quần thể F1 này đã phân tách (50% bán hợp tử và 50% khuyết thiếu) và quá trình chọn lựa đối với các thực vật chuyển gen không được thực hiện trước các lần xếp hạng tổn thương. Các mức xếp hạng tổn thương trung bình tổng thể của quần thể như vậy được dự kiến là cao hơn quần thể chuyển gen thuần nhất vì thật khó phân biệt các thực vật không chuyển gen với các thực vật chuyển gen. Các thử nghiệm được thực hiện ở hai địa điểm với hai lần lặp lại như nhau và 3 lần xử lý cho mỗi cấu trúc. Cây ngô không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng âm. Phương pháp xử lý bằng việc áp dụng các chất diệt cỏ là như sau: Xử lý 1 là S-3100 ở mức 0,036lb ai/mẫu Anh được áp dụng ở mức V2, sau đó là (fb) V4, sau đó là V8; Xử lý 2: là S-3100 ở mức 0,072lb ai/mẫu Anh được áp dụng ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8; Xử lý 3: là S-3100 ở mức 0,144 lb ai/mẫu Anh được áp dụng ở V2, sau đó là V4, sau đó là V8. Các mức xếp hạng phần trăm tổn thương cây trồng được đánh giá ở giai đoạn sinh trưởng V2 (CIPV2) và ở giai đoạn sinh trưởng V4 (CIPV4) vào thời điểm 5 đến 7 ngày sau khi xử lý (sai số V2 và sai số V4 là một nửa mức chênh lệch đáng kể ít nhất (LSD)). Các mức xếp hạng tổn thương cây trồng được kết hợp đối với cả hai địa điểm. Tất cả các thực vật không chuyển gen và thực vật có các sự biến được tạo ra bằng cách sử dụng cấu trúc 16 (12G088600TP (SEQ ID NO:38) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43)) đều thể hiện tổn thương từ 94,6% - 99,5% sau cả việc áp dụng chất diệt cỏ V2 và việc áp dụng chất diệt cỏ V4 đối với mỗi lần xử lý trong số ba lần xử lý. Thực vật có các sự biến được tạo ra bằng cách sử dụng cấu trúc 6 (APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43)) đã thể hiện tổn thương chỉ 30% đến 50% sau việc áp dụng chất diệt cỏ V2 và đã không thể hiện tổn thương nào sau việc áp dụng chất diệt cỏ V4. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 13. Bảng 13. Thử nghiệm thực địa về độ hiệu nghiệm đối với ngô F1 chứa PPO H_N10 (SEQ

ID NO:43)

Xử lý	Cấu trúc	CTP	CTP SEQ ID NO	CIPV2	CIPV4	Sai số V2	Sai số V4
Xử lý 1	Đối chứng âm	không sẵn có	không sẵn có	94,6	99	8,6	1,2
	6	APG6	1	37,5	0	8,6	1,2
	16	12G088600TP	38	96,3	98,5	8,6	1,2
Xử lý 2	Đối chứng âm	không sẵn có	không sẵn có	99,5	99,5	5,4	0
	6	APG6	1	37,5	0	5,4	0
	16	12G088600TP	38	99,5	99,5	5,4	0
Xử lý 3	Đối chứng âm	không sẵn có	không sẵn có	99,5	99,5	0	0
	6	APG6	1	50	0	0	0
	16	12G088600TP	38	99,5	99,5	0	0

Dữ liệu ở thực địa và ở nhà kính ngô chuyển gen F1 đã chứng minh rằng APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) đã tạo ra tỷ lệ tổn thương giảm khi được biểu hiện ở các thực vật chuyển gen so với tỷ lệ tổn thương khi 12G088600TP (SEQ ID NO:38) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) được biểu hiện ở các thực vật chuyển gen. Xem, Hình 1.

Các vật truyền biến nạp thực vật được tạo ra dùng để biểu hiện *in planta* PPO H_N40 (SEQ ID NO:54) hoặc PPO H_N90 (SEQ ID NO:50) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào APG6 (SEQ ID NO:1), CTP D, hoặc CTP E. Ngô (01DKD2) được biến nạp bằng cách sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* và các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các mẫu lá được lấy từ thực vật R0 thu được được phân tích bằng PCR để xác định số bản sao của dạng chèn gen được chuyển. Mỗi thực vật R0 chứa một sự biến biến nạp độc nhất được phun bằng 40g ai/ha hoặc 80g ai/ha của S-3100 xấp xỉ ở giai đoạn sinh trưởng V5 và các mức xếp hạng tổn thương được lấy 4-7 ngày sau khi xử lý. Số thực vật có tổn thương $\leq 10\%$ (có tính chống chịu cao) hoặc tổn thương $\leq 20\%$

(có tính chống chịu) của tổng số thực vật được phun được ghi lại. Thực vật mà được xác định là các sự biến bản sao đơn lẻ và vượt qua lần phun ở mức tổn thương $\leq 20\%$ được tiến tới quá trình tự lai tạo và quá trình lai ngoài chủng. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 14.

Bảng 14. Đánh giá khả năng chống chịu chất diệt cỏ CTP-PPO ở ngô chuyển gen

Dạng kết cấu cấu trúc	CTP	PPO	Tỷ lệ S- 3100 (g ai/ha)	Tổn thương $\leq 10\%$	Tổn thương $\leq$ 20%
17	APG6	H_N40	80	42/112 (37,5%)	65/112 (58%)
17	D	H_N40	80	0/46 (0%)	1/46 (2,2%)
17	E	H_N40	40	0/101 (0%)	13/101 (12,9%)
17	APG6	H_N90	40	55/112 (49,1%)	63/112 56,3%)
18	APG6	H_N40	80	45/112 (40,2%)	66/112 (58,9%)
18	E	H_N40	40	9/112 (8%)	36/112 (32,1%)
19	APG6	H_N40	80	12/56 (21,4%)	23/56 (41,1%)
19	E	H_N40	40	3/112 (2,7%)	9/112 (8,0%)

Các kết quả thể hiện rằng APG6 (SEQ ID NO:1) đã đem lại khả năng chống chịu chất diệt cỏ một cách nhất quán cao hơn so với thực vật được biến nạp bằng CTP D hoặc CTP E khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào H_N40 (SEQ ID NO:54) hoặc H_N90 (SEQ ID NO:50). APG6 khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào H_N40 đã đem lại 21,4% đến 40,2% số thực vật chuyển gen có tính chống chịu cao và 41,1% đến 58,9% số thực vật chuyển gen có tính chống chịu đối với S-3100 ở mức 80g ai/ha. APG6 khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào H_N90 đã đem lại 49,1% số thực vật chuyển gen có tính chống chịu cao và 56,3% số thực vật chuyển gen có

tính chống chịu đối với S-3100 ở mức 40g ai/ha. CTP D khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào H_N40 đã đem lại 0% số thực vật chuyển gen có tính chống chịu cao và 2,2% có tính chống chịu đối với S-3100 ở mức 80g ai/ha. CTP E khi được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào H_N40 đã đem lại 0% đến 8% số thực vật chuyển gen có tính chống chịu cao và 12,9% đến 32,1% có tính chống chịu đối với S-3100 ở tỷ lệ chất diệt cỏ thấp hơn là 40g ai/ha.

Ngô lai F1 chuyển gen biểu hiện APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 được đánh giá về khả năng chống chịu đối với bảy chất diệt cỏ PPO khác nhau: S-3100, Fomesafen, Acifluorfen, Lactofen, Flumioxazin, Sulfentrazone, và Saflufenacil. Hạt giống được kết hợp thể hiện 5 sự biến động nhất được trồng ở các chậu trong nhà kính cùng với hạt giống ngô lai trong vai trò là đối chứng âm.

Để kiểm tra về khả năng chống chịu chất diệt cỏ trước khi mọc, các chất diệt cỏ PPO được áp dụng một cách riêng biệt ở một trong số hai tỷ lệ với sáu lần lặp lại cho mỗi lần xử lý như sau: S-3100 (80g ai/ha hoặc 160g ai/ha), fomesafen (Reflex®, 840g ai/ha hoặc 1680g ai/ha), flumioxazin (Valor® SX, 210g ai/ha hoặc 420g ai/ha), sulfentrazone (Spartan® 4L, 840g ai/ha hoặc 1680g ai/ha), và saflufenacil (Sharpen®, 200g ai/ha hoặc 400g ai/ha). Thực vật được xếp hạng về tỷ lệ phần trăm của tổn thương cây trồng ở thời điểm 20 ngày sau khi xử lý, và hạt giống ngô được lấy vào trong vai trò là đối chứng âm. Các thực vật chuyển gen có APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 có các mức xếp hạng tổn thương đối với các chất diệt cỏ PPO khác nhau được áp dụng trước khi mọc nằm trong khoảng từ 0% đến 5,8%, thể hiện rằng APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 đã đem lại khả năng chống chịu trước khi mọc tuyệt hảo cho ngô ở cả hai tỷ lệ chất diệt cỏ đối với tất cả năm chất diệt cỏ PPO. Cây ngô đối chứng âm có các mức xếp hạng tổn thương nằm trong khoảng từ 17,5% đến 94,2%, ngoại trừ Saflufenacil, chất này được dự kiến vì chất diệt cỏ này được đưa ra thị trường để sử dụng ở cây ngô thông thường. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 15 có sai số chuẩn được thể hiện ở dạng +/-.

Bảng 15. Các mức xếp hạng tổn thương trước khi mọc do chất diệt cỏ PPO ở ngô

Lần xử lý số	Tác nhân hóa học	Tỷ lệ (g ai/ha)	% Tổn thương đối chứng âm	% Tổn thương PPO H_N10
1	S-3100	80	19,2% +/- 2,39	3,3% +/- 1,67

2		160	20,8% +/- 8,31	4,2% +/- 1,54
3	Fomesafen	840	75,8% +/- 5,83	4,2% +/- 1,54
4		1680	94,2% +/- 1,54	5,8% +/- 0,83
5	Flumioxazin	210	30% +/- 6,32	1,7% +/- 1,05
6		420	60,8% +/- 6,38	2,5% +/- 1,71
7	Sulfentrazone	840	17,5% +/- 11,6	0% +/- 0
8		1680	20% +/- 11,11	0% +/- 0
9	Saflufenacil	200	0% +/- 0	0% +/- 0
10		400	0,8% +/- 0,83	0,8% +/- 0,83

Để kiểm tra về khả năng chống chịu chất diệt cỏ sau khi mọc (V3 đến V4), các chất diệt cỏ PPO được áp dụng một cách riêng biệt ở một trong số ba tỷ lệ với sáu lần lặp lại cho mỗi lần xử lý như sau: S-3100 (40g ai/ha, 80g ai/ha, hoặc 160g ai/ha), fomesafen (Reflex®, 420g ai/ha, 840g ai/ha hoặc 1680g ai/ha), acifluorfen (Ultra Blazer®, 420g ai/ha, 840g ai/ha hoặc 1680g ai/ha), lactofen (Cobra®, 220g ai/ha, 440g ai/ha hoặc 880g ai/ha), flumioxazin (Valor® SX, 105g ai/ha, 210g ai/ha hoặc 420g ai/ha), sulfentrazone (Spartan® 4L, 420g ai/ha, 840g ai/ha hoặc 1680g ai/ha), và saflufenacil (Sharpen®, 100g ai/ha, 200g ai/ha hoặc 400g ai/ha). Thực vật được xếp hạng về tỷ lệ phần trăm của tổn thương cây trồng ở thời điểm 14 ngày sau khi xử lý, và hạt giống ngô lai thông thường được lấy vào trong vai trò là đối chứng âm. Các thực vật chuyển gen có APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 có các mức xếp hạng tổn thương đối với các chất diệt cỏ PPO khác nhau được áp dụng sau khi mọc nằm trong khoảng từ 0,5% đến 5,8%, ngoại trừ fomesafen ở mức 1680g ai/ha trong đó mức xếp hạng tổn thương là 13,8%, thể hiện rằng APG6 được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 đã đem lại khả năng chống chịu sau khi mọc tuyệt hảo cho ngô ở tất cả các tỷ lệ chất diệt cỏ đối với tất cả bảy chất diệt cỏ PPO. Cây ngô đối chứng âm có các mức xếp hạng tổn thương nằm trong khoảng từ 36,7% đến 100%. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 16 có sai số chuẩn được thể hiện ở dạng +/-.

Bảng 16. Các mức xếp hạng tổn thương sau khi mọc do chất diệt cỏ PPO ở ngô

Chất diệt cỏ PPO	Tỷ lệ (g ai/ha)	% Tổn thương Đối chứng âm	% Tổn thương PPO H_N10
S-3100	40	100% =/-0	1,80% =/-0,87
	80	100% =/-0	3,80% =/-0,83
	160	100% =/-0	3,80% =/-0,98
Fomesafen	420	98,50% =/-0,81	2,30% =/-0,8
	840	100% =/-0	4,70% =/-0,8
	1680	100% =/-0	13,80% =/-1,54
Acifluorfen	420	84,20% =/-5,69	1,80% =/-0,87
	840	87,50% =/-2,14	4,70% =/-0,8
	1680	95,50% =/-1,38	5,30% =/-0,61
Lactofen	220	58,30% =/-3,07	1% =/-0,63
	440	59,20% =/-2,71	2,20% =/-1,01
	880	61,70% =/-6,54	5,80% =/-0,98
Flumioxazin	105	51,70% =/-3,07	1% =/-0,63
	210	69,20% =/-6,38	1,30% =/-0,88
	420	68,30% =/-2,79	1,80% =/-0,87
Sulfentrazone	420	61,70% =/-5,43	0,50% =/-0,5
	840	79,20% =/-5,97	1% =/-0,63
	1680	84,20% =/-3,27	2,70% =/-0,92
Saflufenacil	100	43,30% =/-2,11	0,80% =/-0,83
	200	36,70% =/-2,11	1,30% =/-0,88
	400	53,30% =/-2,11	1,80% =/-0,87

Ví dụ 7: Mức biểu hiện CTP-PPO ở đậu tương chuyển gen

Các enzym PPO được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào các CTP khác nhau được biểu hiện ở cây đậu tương chuyển gen, và các thực vật chuyển gen được phân tích về khả năng chống chịu chất diệt cỏ PPO.

Các vật truyền biến nạp thực vật được tạo ra dùng để biểu hiện *in planta* 12G088600TP (SEQ ID NO:38) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO

H_N10 (SEQ ID NO:43) hoặc APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43). Đậu tương A3555 được biến nạp bằng cách sử dụng các vật truyền biến nạp thực vật này và *Agrobacterium tumefaciens* bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thực vật con chuyển gen R0 đã được tái tạo được sinh trưởng trong nhà kính, được tự lai tạo, và hạt giống R1 được thu gom. Thực vật R1 chuyển gen được phun trong nhà kính bằng một trong số ba lần xử lý chất diệt cỏ được áp dụng ở mức V4 và R1: (1) S-3100 ở mức 5 gam ai/ha, (2) S-3100 ở mức 10 gam ai/ha, hoặc (3) S-3100 ở mức 30 gam ai/ha. Các mức xếp hạng tổn thương cây trồng được đánh giá ở thời điểm mười ngày sau khi xử lý. Các thực vật chuyển gen biểu hiện APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) có các mức xếp hạng tổn thương nằm trong khoảng từ 4,2%, 7,8%, và 9,4% ở giai đoạn V4 và 3%, 6,5%, đến 15,7% ở giai đoạn R1, lần lượt ở các tỷ lệ 5g ai/ha, 10g ai/ha và 30g ai/ha. Các thực vật chuyển gen biểu hiện 12G088600TP (SEQ ID NO:38) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) có các mức xếp hạng tổn thương trung bình là 82,7%, 92,7%, đến 98,2%% lần lượt ở các tỷ lệ 5g ai/ha, 10g ai/ha và 30g ai/ha, và đã không sống sót để xếp hạng ở giai đoạn R1. Thực vật đối chứng âm đã có các mức xếp hạng tổn thương trung bình tương tự là 89%, 98%, và 100% lần lượt ở các tỷ lệ 5g ai/ha, 10g ai/ha và 30g ai/ha, và đã không sống sót để xếp hạng ở giai đoạn R1. Dữ liệu được đưa ra trong Bảng 17.

Bảng 17: Thực hiện kiểm tra chất diệt cỏ PPO ở đậu tương R1

Cấu trúc	Tỷ lệ S-3100	Tổn thương giai đoạn V4	Tổn thương giai đoạn R1
APG6 + H_N10	5g/ha	4,2%	3%
APG6 + H_N10	10g/ha	7,8%	6,5%
APG6 + H_N10	30g/ha	9,4%	15,7%
12G088600TP + H_N10	5g/ha	82,7%	không sẵn có
12G088600TP + H_N10	10g/ha	92,7%	không sẵn có
12G088600TP + H_N10	30g/ha	98,2%	không sẵn có

Đối chứng âm	5g/ha	89%	không sẵn có
Đối chứng âm	10g/ha	98%	không sẵn có
Đối chứng âm	30g/ha	100%	không sẵn có

Các vật truyền biến nạp thực vật được tạo ra dùng để biểu hiện *in planta* PPO H_N90 (SEQ ID NO:47) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào một trong số ba CTP khác nhau, APG6 (SEQ ID NO:1) CTP F, và CTP H. Đậu tương A3555 được biến nạp bằng cách sử dụng các vật truyền biến nạp thực vật này và *Agrobacterium tumefaciens* bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thực vật con chuyển gen R0 đã được tái tạo được sinh trưởng trong nhà kính, và các mẫu lá được lấy từ thực vật R0 thu được được phân tích bằng PCR để nhận diện thực vật chứa một bản sao đơn lẻ của sự biến. Thực vật R0 bản sao đơn lẻ chuyển gen, mà mỗi thực vật này thể hiện một sự biến độc nhất, được phun trong nhà kính bằng phương pháp xử lý chất diệt cỏ S-3100 ở mức 20g ai/ha được áp dụng ở mức xấp xỉ giai đoạn V3. Các mức xếp hạng tổn thương được lấy 14 ngày sau khi xử lý ở dạng số mà được xem là có tính chống chịu cao (tổn thương $\leq 10\%$) hoặc có tính chống chịu (tổn thương $\leq 20\%$). Các thực vật chuyển gen biểu hiện APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N90 (SEQ ID NO:47) đã đem lại 21,4% số sự biến độc nhất là có tính chống chịu cao và 57,1% là có tính chống chịu. Các thực vật chuyển gen biểu hiện CTP F được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N90 (SEQ ID NO:47) đã đem lại 11,7% số sự biến độc nhất là có tính chống chịu cao và 41,1% là có tính chống chịu. Các thực vật chuyển gen biểu hiện CTP H được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N90 PPO H_N90 (SEQ ID NO:47) đã không đem lại sự biến độc nhất nào có tính chống chịu cao hoặc có tính chống chịu. Dữ liệu được trình bày trong Bảng 18.

Bảng 18. Đánh giá độ hiệu nghiệm S-3100 ở đậu tương R0

CTP	PPO	Tổn thương $\leq 10\%$	Tổn thương $\leq 20\%$
APG6	H_N90	3/14 (21,4%)	8/14 (57,1%)
F	H_N90	2/17 (11,7%)	7/17 (41,1%)
H	H_N90	0/22 (0%)	0/22 (0%)

Dữ liệu này đã chứng minh rằng CTP đặc hiệu mà được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào enzym PPO là quan trọng đối với việc đạt được khả năng chống chịu chất diệt cỏ, vì vậy thể hiện tầm quan trọng của sự lựa chọn CTP và tính ưu việt bất ngờ của CTP APG6 so với các CTP khác để sử dụng trong việc tạo ra các thực vật chuyển gen có tính chống chịu chất diệt cỏ.

Ví dụ 8: Mức biểu hiện CTP-PPO ở bông chuyển gen

Các vật truyền biến nạp thực vật được tạo ra dùng để biểu hiện APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) ở cây bông chuyển gen, và các thực vật chuyển gen được phân tích về khả năng chống chịu chất diệt cỏ PPO. Bông DP393 được biến nạp bằng cách sử dụng các vật truyền biến nạp thực vật và *Agrobacterium tumefaciens* bằng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các thực vật con chuyển gen R0 đã được tái tạo được sinh trưởng trong nhà kính, và các mẫu lá được lấy từ thực vật R0 thu được được phân tích bằng PCR để nhận diện thực vật chứa một bản sao đơn lẻ của sự biến. Thực vật R0 bản sao đơn lẻ chuyển gen, mỗi thực vật này thể hiện một sự biến độc nhất, được phun trong nhà kính bằng phương pháp xử lý chất diệt cỏ là 20g ai/ha của S-3100 được áp dụng ở giai đoạn V2. Ngoài ra, dạng đa bản sao chuyển gen (≥ 2 bản sao/thực vật) được phun trong nhà kính bằng phương pháp xử lý chất diệt cỏ là 20g ai/ha của S-3100 được áp dụng ở giai đoạn V2. Các mức xếp hạng tổn thương được lấy ở ba ngày sau khi xử lý.

Đối chứng âm, bông DP393, đã có tổn thương 100% ba ngày sau khi xử lý chất diệt cỏ bằng 20g ai/ha của S-3100. Ngược lại, 21 thực vật R0 có bản sao đơn lẻ đã có mức tổn thương trung bình là 26,7%. Mức phân bố của tổn thương của 21 thực vật R0 có bản sao đơn lẻ này là: 3 thực vật không có tổn thương nào; 3 thực vật có tổn thương 10%; 3 thực vật có tổn thương 15%; 2 thực vật có tổn thương 20%; 7 thực vật có tổn thương 30%; và 3 thực vật có tổn thương 40%. Đối với thực vật R0 đa bản sao, 14 thực vật đã tiếp nhận phương pháp xử lý chất diệt cỏ và tổn thương trung bình là 10,4%. Mức phân bố của tổn thương của 14 thực vật đa bản sao là: 5 thực vật không có tổn thương nào; 3 thực vật có tổn thương 5%; 1 thực vật có tổn thương 10%; 2 thực vật có tổn thương 15%; 1 thực vật có tổn thương 20%; 1 thực vật có tổn thương 30%; và 1 thực vật có tổn thương 40%. Dữ liệu này chứng minh rằng bông chuyển gen R0 biểu hiện APG6 (SEQ ID NO:1) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào PPO H_N10 (SEQ ID NO:43) đã có khả năng

chống chịu đối với việc áp dụng chất diệt cỏ S-3100 ở mức 20g ai/ha được áp dụng ở giai đoạn V2.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN mã hóa peptit vận chuyển lục lạp (CTP) được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào trình tự ADN mã hóa dicamba monooxygenaza (DMO) hoặc protoporphyrinogen oxidaza (PPO), trong đó CTP này bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3, và trong đó trình tự ADN mã hóa CTP này được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào gen khởi đầu khác nguồn gốc có chức năng trong tế bào thực vật.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN mã hóa CTP bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:7-14.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó DMO hoặc PPO bao gồm trình tự polypeptit được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:18-27 và 40-59.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 3, trong đó trình tự ADN mã hóa DMO hoặc PPO bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:28-37 và 61-102.
5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó CTP này được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào protein DMO, và CTP này bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1-3.
6. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó CTP này được liên kết theo kiểu có thể hoạt động được vào protein PPO, và CTP này bao gồm trình tự được chọn lựa từ nhóm gồm các SEQ ID NO:1 và 2.
7. Tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN theo điểm 1.
8. Tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen theo điểm 7, trong đó thực vật này là thực vật một lá mầm.
9. Tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen theo điểm 8, trong đó thực vật này là cây ngô hoặc cây lúa mì.

10. Tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen theo điểm 7, trong đó thực vật này là thực vật hai lá mầm.
11. Tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, hạt giống hoặc thực vật chuyển gen theo điểm 10, trong đó thực vật này là đậu tương, bông, hoặc thực vật thuộc chi *Brassica*.
12. Phương pháp sản xuất thực vật chống chịu chất diệt cỏ bao gồm các bước:
 - a) biến nạp tế bào thực vật bằng phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm; 1 và
 - b) tái tạo thực vật từ tế bào thực vật đã được biến nạp mà chứa cấu trúc ADN này.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó thực vật đã được tái tạo này có tính chống chịu đối với chất diệt cỏ được chọn lựa từ nhóm gồm chất ức chế PPO và dicamba.
14. Phương pháp sản xuất thực vật chống chịu chất diệt cỏ bao gồm các bước:
 - a) lai thực vật bố mẹ chứa phân tử ADN theo điểm 1 với chính nó hoặc với một thực vật thứ hai để tạo ra một hoặc nhiều thực vật thế hệ con; và
 - b) chọn lựa thực vật thế hệ con chứa phân tử ADN đã nêu.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó thực vật thế hệ con này có tính chống chịu đối với chất diệt cỏ được chọn lựa từ nhóm gồm chất ức chế PPO và dicamba.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó thực vật thế hệ con này có tính chống chịu đối với chất diệt cỏ ức chế PPO được chọn lựa từ nhóm gồm S-3100, fomesafen, acifluorfen, lactofen, flumioxazin, sulfentrazone, và saflufenacil.
17. Phương pháp biểu hiện dicamba monooxygenase (DMO) hoặc protoporphyrinogen oxidase (PPO) bao gồm việc đưa phân tử ADN theo điểm 1 vào tế bào thực vật.
18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó quá trình đưa vào bao gồm việc biến nạp tế bào thực vật.
19. Phương pháp kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ dại trong môi trường sinh trưởng cây

trồng bao gồm các bước:

a) trồng hạt giống hoặc thực vật theo điểm 7 trong môi trường sinh trưởng cây trồng;
và

b) áp dụng cho môi trường sinh trưởng cây trồng một lượng dicamba hoặc chất diệt cỏ ức chế PPO hữu hiệu để kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ dại.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó chất diệt cỏ này không gây thiệt hại cho hạt giống hoặc thực vật.
21. Phương pháp theo điểm 19, trong đó hạt giống hoặc thực vật này là hạt giống hoặc thực vật một lá mầm.
22. Phương pháp theo điểm 21, trong đó thực vật này là cây ngô hoặc cây lúa mì.
23. Phương pháp theo điểm 19, trong đó hạt giống hoặc thực vật này là hạt giống hoặc thực vật hai lá mầm.
24. Phương pháp theo điểm 23, trong đó thực vật này là đậu tương, bông, hoặc thực vật thuộc chi *Brassica*.
25. Phương pháp theo điểm 19, trong đó chất diệt cỏ này là dicamba.
26. Phương pháp theo điểm 19, trong đó chất diệt cỏ này là chất ức chế PPO.



Hình 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP, THỰC VẬT, TẾ BÀO THỰC VẬT, BỘ PHẬN CỦA THỰC VẬT HOẶC HẠT GIỐNG CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP NÀY, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT THỰC VẬT CHỐNG CHỊU CHẤT DIỆT CỎ VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CỎ DẠI TRONG MÔI TRƯỜNG SINH TRƯỞNG CÂY TRỒNG

<130> MONS:389wo

<150> US 62/270,180

<151> 21-12-2015

<150> US 62/364,715

<151> 20-07-2016

<160> 102

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	Val
1				5					10					15	

Ser	Val	Gly	Thr	Glu	Thr	Arg	Arg	Ile	Tyr	Ser	Phe	Ser	His	Leu	Gln
			20					25					30		

Pro	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Lys	Pro	Ser	Ser	Phe	Lys	Ser	Leu	Lys
		35					40					45			

Leu	Lys	Gln	Ser	Ala	Arg	Leu	Thr	Arg	Arg	Leu	Asp	His	Arg	Pro	Phe
	50					55					60				

Val	Val	Arg	Cys
65			

<210> 2

<211> 68

<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 2

Met Ala Ser Ser Thr Thr Thr Ala Thr Ala Ala Phe Ser Gly Val Val
 1 5 10 15

Ser Val Gly Thr Glu Thr Arg Arg Ile Tyr Ser Phe Ser His Leu Gln
 20 25 30

Pro Ser Ala Ala Phe Pro Ala Lys Pro Ser Ser Phe Lys Ser Leu Lys
 35 40 45

Leu Lys Gln Ser Ala Arg Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Arg Pro Phe
 50 55 60

Val Val Arg Cys
 65

<210> 3

<211> 61

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

Met Ala Pro Ala Leu Ser Arg Ser Leu Tyr Thr Ser Pro Leu Thr Ser
 1 5 10 15

Val Pro Ile Thr Pro Val Ser Ser Arg Leu Ser His Leu Arg Ser Ser
 20 25 30

Phe Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Arg Thr Gly Val Ser Cys Ser Trp
 35 40 45

Asn Leu Glu Lys Arg Cys Asn Arg Phe Ala Val Lys Cys
 50 55 60

<210> 4

<211> 72

<212> PRT

<213> Dạ yến thảo

<400> 4

Met Ala Gln Ile Asn Asn Met Ala Gln Gly Ile Gln Thr Leu Asn Pro
 1 5 10 15

Asn Ser Asn Phe His Lys Pro Gln Val Pro Lys Ser Ser Ser Phe Leu
 20 25 30

Val Phe Gly Ser Lys Lys Leu Lys Asn Ser Ala Asn Ser Met Leu Val
 35 40 45

Leu Lys Lys Asp Ser Ile Phe Met Gln Lys Phe Cys Ser Phe Arg Ile
 50 55 60

Ser Ala Ser Val Ala Thr Ala Cys
 65 70

<210> 5
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Đậu Hà Lan

<400> 5

Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala
 1 5 10 15

Ser Arg Gly Gln Ser Ala Ala Met Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
 20 25 30

Met Thr Gly Phe Pro Val Arg Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
 35 40 45

Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys
 50 55

<210> 6
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Lúa

<400> 6

Met Ala Ala Leu Thr Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Ala Thr Gly Phe
 1 5 10 15

Gly Ile Ala Asp Arg Ser Ala Pro Ser Ser Leu Leu Arg His Gly Phe
 20 25 30

Gln Gly Leu Lys Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gly Asp Ala Thr Ser Leu
 35 40 45

Ser Val Thr Thr Ser Ala Arg Ala Thr Pro Lys Gln Gln Arg Ser Val
 50 55 60

Gln Arg Gly Ser Arg Arg Phe Pro Ser Val Val Val Cys
 65 70 75

<210> 7
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 7
 atggccaccg ccaccactac cgccaccgct gcgttctccg gcgtgggtgag cgtcggcact 60
 gagacgcgca ggatctactc cttcagccac ctccagcctt ctgctgcgtt ccccgctaag 120
 ccgtcttcgt tcaagagcct gaagctgaaa cagtcgcgac gccttaccg gcgcctggac 180
 cataggccat tcgttgtcag gtgc 204

<210> 8
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 8
 atggcgacgg ctacgacgac tgctacggcg gcgttttagtg gtgtagtcag tgtaggaacg 60
 gagactcgaa ggatttattc gttttctcat cttcaacctt ctgcggcttt tccggcgaag 120
 cctagttcct tcaaattctt caaattaaag cagagcgcgga ggctcacacg gcggcttgat 180
 catcggccgt tcgttgtccg atgt 204

<210> 9
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 9
 atggctactg ctactaccac agctaccgct gcattctctg gtgttgtag tgttgaacc 60
 gagacacgta gaatttactc tttctcacac ttgcaaccta gcgcagcctt ccctgccaaag 120
 ccatcatcct ttaagtcctt gaagctgaaa cagtcggcga ggcttacgag gcgcctcgat 180
 catagaccct ttgtgggtccg atgc 204

<210> 10
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 10
 atggcaaccg cgactaccac cgcaacggca gctttctccg gggtagtttc agtcgggacg 60
 gaaaccgcga ggatctattc gttcagccat ttgcaacctt ccgcggcctt tcccgccaaa 120
 ccctcgtctt ttaaatacgt gaaactcaaa cagtcagcac ggttgaccgc aagattggac 180
 caccgcccac ttgttagtgag gtgc 204

<210> 11
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 11
 atggccacgg ccacgaccac ggcaacagcg gccttttcgg gcgttgatc cgtcgggaca 60
 gaaaccagac gcatatatag cttctcacac ctgcaaccta gtgccgcttt tccggccaaa 120
 cctagctcgt ttaaatacgt gaagctcaaa cagagcgctc ggtaactag acgactggac 180
 cataggccac ttgtcgtccg ctgc 204

<210> 12
 <211> 204
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 12
 atggcttcct ccacgacgac tgctacggcg gcgttttagtg gtgtagtcag tgtaggaacg 60
 gagactcgaa ggatttatcc gttttctcat cttcaacctt ctgcggcttt tccggcgaag 120
 cctagttcct tcaaattctct caaattaaag cagagcgcgga ggctcacacg gcggcttgat 180
 catcggccgt tcgttggtccg atgt 204

<210> 13
 <211> 183
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 13
 atggctcctg ctttgagtag aagtctctac acatctcctt tgacttcagt tccaatcact 60
 cctgtctctt ctgcgtcttc tcatctgaga agctcgtttc tcccacacgg cggcgcttta 120
 agaaccggcg tttcgtgtag ctggaatctc gaaaagagat gtaaccgatt cgccgtgaag 180
 tgt 183

<210> 14
 <211> 183
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 14
 atggctccgg ctctcagcgg ctccctctac accagccctc tcacctccgt gcccatcacc 60
 ccggtgtcct cccgcctctc ccacctccgc tcctccttcc tccctcacgg cggcgcgctc 120
 cgcaccggcg tgtcctgctc ctggaacctg gagaagcgct gcaaccgctt cgccgtgaag 180
 tgc 183

<210> 15
 <211> 216
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 15
 atggcccaga tcaacaacat ggcccagggc atccagaccc tgaaccctaa ctctaacttc 60
 cacaagccgc aagtgcccaa gtctagctcc ttctcgtgtg tcgggtccaa gaagctcaag 120
 aatagcgcca attccatgct ggtcctgaag aaagactcga tcttcatgca gaagttctgc 180
 tccttttcgca tcagtgccttc ggttgcgact gcctgc 216

<210> 16
 <211> 171
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 16
 atggcttcta tgatatactc ttccgctgtg acaacagtca gccgtgcctc tagggggcaa 60
 tccgccgcaa tggctccatt cggcggcctc aaatccatga ctggattccc agtgaggaag 120
 gtcaacactg acattacttc cattacaagc aatgggtggaa gagtaaagtg c 171

<210> 17
 <211> 231
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 17
 atggcggctc tcaccacgtc ccagctcgcc acctcggcc cgggcttcgg catcgccgac 60
 aggtcggcgc cgtcgtcgtc gtcgccac gggttccagg gcctcaagcc ccgcagcccc 120
 gccggcgggc acgcgacgtc gtcagcgtg acgaccagcg cgcgcgcgac gcccaagcag 180
 cagcggtcgg tgcagcgtgg cagccggagg ttccccctccg tcgtcgtgtg c 231

<210> 18
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 18

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu

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

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
 290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala
 340

<210> 19
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 19

Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala
 20 25 30

Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile Cys
 35 40 45

Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His

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

Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala
 275 280 285

Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg
 290 295 300

Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp
 305 310 315 320

Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu
 325 330 335

Glu Ala Ala

<210> 20
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 20

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp

100 105 110
 Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125
 Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140
 Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His
 145 150 155 160
 Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175
 Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190
 Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg
 195 200 205
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220
 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
 290 295 300
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala
 340

<210> 21
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 21

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His

38135

145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190

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

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
 290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala
 340

```
<210> 22
<211> 340
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo
```

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 22

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190

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

195 200 205
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220
 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
 290 295 300
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335
 Leu Glu Ala Ala
 340
 <210> 23
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Tái tổ hợp
 <400> 23
 Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190

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

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu

245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
325 330 335

Leu Glu Ala Ala
340

<210> 24
<211> 340
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 24

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190

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

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg

290 295 300
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335
 Leu Glu Ala Ala
 340
 <210> 25
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo
 <220>
 <223> Tái tổ hợp
 <400> 25
 Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
 20 25 30
 Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
 35 40 45
 Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
 50 55 60
 His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
 65 70 75 80
 Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95
 Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys
 100 105 110
 Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190

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

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
 290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala

340

<210> 26
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 26

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
 20 25 30

Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
 35 40 45

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
 50 55 60

His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
 65 70 75 80

Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
 115 120 125

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val
 130 135 140

Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His
 145 150 155 160

Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg
 165 170 175

Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met
 180 185 190

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

Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys
 210 215 220

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
 245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
 260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
 275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
 290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
 305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
 325 330 335

Leu Glu Ala Ala
 340

<210> 27
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 27

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

Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro
225 230 235 240

Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu
245 250 255

Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly
260 265 270

Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln
275 280 285

Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg
290 295 300

Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys
305 310 315 320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln
325 330 335

Leu Glu Ala Ala
340

<210> 28
<211> 1023
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 28
atgctcactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag 60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga 120
gttgctcgctg ccctgcttga tatttgtccg catcgcttcg ctccgttgag tgacggtatt 180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag 240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actgcgagat 360

cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420
 tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac 480
 gctcagtagc tgcaccgcgc taacgccccaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540
 gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600
 gttctcatgg ctaagttctt gcggtgtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660
 cgggtggaata aggtgtcggc tatgtctgaac ttcacgcggg tcgcgccgga agggacgccg 720
 aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780
 tgccattact tcttcggtag ttcccgaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840
 gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900
 atcgaaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccgccat gttgtcctgc 960
 gacgaggcag ccgtcagggt atccaggagc attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020
 tga 1023

<210> 29
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 29 60
 atgaccttcg tccgcaatgc ctggtatgtg gcggcgctgc ccgaggaact gtccgaaaag
 ccgctcggcc ggacgattct cgacacaccg ctgcgcctct accgccagcc cgacggtgtg 120
 gtgcgggcgc tgctcgacat ctgtccgcac cgcttcgcgc cgctgagcga cggcatcctc 180
 gtcaacggcc atctccaatg cccctatcac gggctggaat tcgatggcgg cgggcagtgc 240
 gtccataacc cgcacggcaa tggcgccgc ccggcttcgc tcaacgtccg ctcttccccg 300
 gtggtggagc gcgacgcgct gatctggatc tggcccggcg atccggcgct ggccgatcct 360
 ggggcgatcc ccgaattcgg ctgccgcgtc gatccgcct atcggaccgt cggcggctat 420
 gggcatgtcg actgcaacta caagctgctg gtcgacaacc tgatggacct cggccacgcc 480
 caatatgtcc atcgcgcaa cgcccagacc gacgccttcg accggctgga gcgcgaggtg 540
 atcgtcggcg acggtgagat acaggcgctg atgaagattc ccggcggcac gccgagcgtg 600
 ctgatggcca agttcctgcg cggcgccaat acccccgtcg acgcttgga cgcacatccgc 660

tggaacaagg tgagcgcgat gctcaacttc atcgcggtgg cgccggaagg caccgccgaag 720
 gagcagagca tccactcgcg cggtagccat atcctgaccc ccgagacgga ggcgagctgc 780
 cattatttct tcggctcctc gcgcaatttc ggcacgacg atccggagat ggacggcggtg 840
 ctgcgacgct ggcaggctca ggcgctggtc aaggaggaca aggtcgctcg cgaggcgatc 900
 gagcgccgcc ggccttatgt cgaggcgaat ggcacccgcc cggcgatgct gtcgtgacgac 960
 gaagccgcag tccgtgtcag ccgagagatc gagaagcttg agcagctcga agccgcctga 1020

<210> 30
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 30
 atgctcacct tcgttaggaa cgcttggtac gtcgcccgtc tccctgagga gctgagcgag 60
 aagcccttgg gtcgcacccat cctagacact ccgttagccc ttaccgcca gcctgacggc 120
 gtagtgggcg ccctgcttga catctgcccg cataggttcg ctccgctcag cgacggcatc 180
 ctgctcaacg ggcacattca gtgcccgtac cacgggctgg aatttgacgg cggtagggcag 240
 tgtgtccaca acccgcacgg caacggcgca cggccagctt ccctcaacgt taggtcgctc 300
 cctgttgtcg agcgcgacgc actgatctgg atctggcctg gcgaccagc tctggccgat 360
 ccaggagcca ttcccgaact cggttgccgc gtggaccag cctatcggac ggtcggcggt 420
 tacgggcacg tcgattgtaa ctataagctc cttgtggaca accttatgga tttggggcac 480
 gctcagtacg tgcaccgggc taacgctcag actgacgcct ttgaccgtct cgaaagggag 540
 gtcacgctcg gcgacggaga gattcaggcg ctgatgaaga tccctggagg cacgccctct 600
 gtgctcatgg cgaagtttct cagaggcgcg aacacgcccg tggacgcctg gaacgacatc 660
 cgctggaata aggtctccgc gatgctgaac ttcatcgccg ttgcgcccga gggcacaccc 720
 aaagagcagt caatccacag cagagggacc catattctta caccggaaac cgaggctagt 780
 tgccactact tcttcggctc gtcacggaat ttcgggatag acgatccgga gatggacggg 840
 gttcttcgat cttggcaagc gcaagctctc gtcaaggaag ataaggtggg cgtggagggt 900
 atcgagcgta ggcgcgccca cggttagggc aacggtatta ggccgcgat gctgtcctgc 960

gacgaggccg cagtttagagt gtcgcgcgag atagaaaagc tggagcagct agaggccgcc 1020
tga 1023

<210> 31
<211> 1023
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 31
atggccactt tcgttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcag 60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga 120
gttgctcgtg ccctgcttga tatttgtccg catcgcttcg ctccgttgag tgacgggtatt 180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag 240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgccctg gagatccagc actcgcagat 360
cccgttgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac 480
gctcagtacg tgcaccgcgc taacgcccac acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540
gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgctg gaacgacatc 660
cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcctcgcgg tcgcgccgga agggacgccg 720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780
tgccattact tcttcggtag ttcccgaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900
atcgaaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccgccat gttgtcctgc 960
gacgaggcag ccgtcagggg atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020
tga 1023

<210> 32
<211> 1023
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 32

```

atgctcactt tcgttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag      60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga      120
gttgctcgctg ccctgcttga tatttgctcg catcgcttcg ctccgttgag tgacggtatt      180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag      240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcatto      300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgccctg gagatccagc actcgcagat      360
cccgttgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt      420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac      480
gctcagtagc tgcaccgcgc taacgccccaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag      540
gtgatcggtg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctgggtg cacaccctca      600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc      660
cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcacgcggg tcgcgcggga agggacgccg      720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc      780
tgccattact tcttcggtag ttcccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt      840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct      900
atcgaaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccgccat gttgtcctgc      960
gacgaggcag ccgtcagggt atccaggggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg      1020
tga                                                                    1023

```

<210> 33

<211> 1023

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 33

```

atggccacct tcgtccgcaa tgcttggtat gtggcggcgc tgcccagga actgtccgaa      60
aagccgctcg gccggacgat tctcgacaca ccgctcgcgc tctaccgcca gcccgacggt      120

```

gtggtcgcg cgctgctcga catctgtccg caccgcttcg cgccgctgag cgacggcatc 180
 ctctgcaacg gccatctcca atgcccctat cacgggcttg aattcgatgg cggcgggcag 240
 tgcgtccata acccgcacgg caatggcgcc cgcccggctt cgctcaacgt ccgctccttc 300
 ccggtggtgg agcgcgacgc gctgatctgg atctgtcccg gcgatccggc gctggccgat 360
 cctggggcga tccccgaactt cggctgccgc gtcgatcccg cctatcggac cgtcggcggc 420
 tatgggcatg tcgactgcaa ctacaagctg ctggctgaca acctgatgga cctcggccac 480
 gcccaatat tccatcgcg caacgcccag accgacgcct tcgaccggct ggagcgcgag 540
 gtgatcgctg gcgacggtga gatacaggcg ctgatgaaga ttcccggcgg cacgccgagc 600
 gtgctgatgg ccaagttcct gcgcgggcgcc aatacccccg tcgacgcttg gaacgacatc 660
 cgctggaaca aggtgagcgc gatgctcaac ttcatcgcg tggcgccgga aggcaccccg 720
 aaggagcaga gcatccactc gcgcggtacc catatcctga cccccgagac ggaggcgagc 780
 tgccattatt tcttcggctc ctcgcgcaat ttcggcatcg acgatccgga gatggacggc 840
 gtgctgcgca gctggcaggc tcaggcgctg gtcaaggagg acaaggctgt cgtcgaggcg 900
 atcgagcgcc gccgcgccta tgtcgaggcg aatggcatcc gcccggcgat gctgtcgtgc 960
 gacgaagccg cagtccgtgt cagccgcgag atcgagaagc ttgagcagct cgaagccgcc 1020
 tga 1023

<210> 34
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 34
 atggccactt tcgttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttctgagga gttgagcgag 60
 aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgta acctgacgga 120
 gttgtcgctg ccctgcttga tatttgtccg catcgcttcg ctccgttgag tgacggtatt 180
 ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtcttg aatttgacgg aggtggccag 240
 tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcatc 300
 cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actcgcagat 360
 cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatecag cttaccgtac tgtcggaggt 420

tacgggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac 480
gctcagtagc tgcaccgcgc taacgccccaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540
gtgatcggtg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctgggtgg cacaccctca 600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtgggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660
cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcacgcgcg tcgcgccgga agggacgccg 720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780
tgccattact tcttcggtag ttcccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggg 840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900
atcgaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gaccgccat gttgtcctgc 960
gacgaggcag ccgtcagggt atccaggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020
tga 1023

<210> 35
<211> 1023
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 35
atgctcacct tcgtccgcaa tgcttggat gtggcggcgc tgcccaggga actgtccgaa 60
aagccgctcg gccggacgat tctcgacaca ccgctcgcgc tctaccgcca gcccgacggt 120
gtggtcgcgc cgctgctcga catctgtccg caccgcttcg cgccgctgag cgacggcatc 180
ctcgtcaacg gccatctcca atgcccctat cacgggctgg aattcgatgg cggcgggcag 240
tgcgtccata accgcacgg caatggcgcc cgcccggctt cgtcaacgt ccgctccttc 300
ccggtgggtg agcgcgacgc gctgatctgg atctgtcccg gcgatccggc gctggccgat 360
cctggggcga tccccgactt cggctgccgc gtcgatcccg cctatcggac cgtcggcggc 420
tatgggcatg tcgactgcaa ctacaagctg ctggctcgaca acctgatgga cctcggccac 480
gcccaatatg tccatcgcgc caacgcccag accgacgcct tcgaccggct ggagcgcgag 540
gtgatcgctg gcgacgggtga gatacaggcg ctgatgaaga ttcccggcgc cacgccgagc 600
gtgctgatgg ccaagttcct gcgcggcgcc aatacccccg tcgacgcttg gaacgacatc 660

cgctggaaca aggtgagcgc gatgctcaac ttcatcgcg tggcgccgga aggcacccccg 720
aaggagcaga gcatccactc gcgcggtacc catatcctga ccccgagac ggaggcgagc 780
tgccattatt tcttcggctc ctgcgcgaat ttcggcatcg acgatccgga gatggacggc 840
gtgctgcgca gctggcaggc tcaggcgctg gtcaaggagg acaaggctcg cgtcgaggcg 900
atcgagcgcc gccgcgccta tgtcgaggcg aatggcatcc gcccgcgat gctgtcgtgc 960
gacgaagccg cagtccgtgt cagccgcgag atcgagaagc ttgagcagct cgaagccgcc 1020
tga 1023

<210> 36
<211> 1023
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 36
atggccacct tcgttaggaa cgcctgttac gtcgccgctc tccctgagga gctgagcgag 60
aagcccttgg gtcgcaccat cctagacact ccgttagccc ttacccgca gcctgacggc 120
gtagtggcgg ccctgcttga catctgcccg cataggttcg ctccgctcag cgacggcatc 180
ctcgtcaacg ggcatcttca gtgcccgtac cacgggctgg aatttgacgg cggtagggcag 240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggcgca cggccagctt ccctcaacgt taggtcgttc 300
cctgttgctg agcgcgacgc actgatctgg atctggcctg gcgaccagc tctggccgat 360
ccaggagcca ttcccgaact cggttgccgc gtggaccag cctatcggac ggtcggcgg 420
tacgggcacg tcgattgtaa ctataagctc cttgtggaca accttatgga tttggggcac 480
gctcagtacg tgcaccgggc taacgctcag actgacgcct ttgaccgtct cgaaagggag 540
gtcatcgctg gcgacggaga gattcaggcg ctgatgaaga tccctggagg cacgccctct 600
gtgctcatgg cgaagtttct cagaggcgcg aacacgccc tggacgcctg gaacgacatc 660
cgctggaata aggtctccgc gatgctgaac ttcatcgccg ttgcgcccga gggcacaccc 720
aaagagcagt caatccacag cagagggacc catattctta caccggaaac cgaggctagt 780
tgccactact tcttcggctc gtcaagggaat ttcgggatag acgatccgga gatggacgg 840
gttcttcgat cttggcaagc gcaagctctc gtcaaggaag ataaggtggc cgtggaggct 900
atcgagcgta gccgcgccta cgttgaggcg aacggtatta ggcccgcgat gctgtcctgc 960

gacgaggccg cagtttagagt gtcgcgcgag atagaaaagc tggagcagct agaggccgcc 1020
tga 1023

<210> 37
<211> 1020
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 37
atgctcactt tcgttagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag 60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga 120
gttgctcgtg ccctgcttga tatttgctcg catcgcttcg ctccgttgag tgacgggtatt 180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag 240
tgtgtccaca acccgctcgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc 300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actcgcagat 360
cccgttgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac 480
gctcagtagc tgcaccgcgc taacgccccaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540
gtgatcaaag gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca 600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660
cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcacgcggg tcgcgccgga agggacgccg 720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780
tgccattact tcttcggtag ttcccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900
atcgaaaggc ggagggctta cgtcgaagcg aacgggatca gacccgccat gttgtcctgc 960
gacgaggcag ccgtcagggg atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020

<210> 38
<211> 35
<212> PRT
<213> Cây gossypium raimondii

<400> 38

Met Leu Asn Ile Ala Pro Ser Cys Val Leu Ala Ser Gly Ile Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Val Thr Lys Met Ala Ser Thr Glu Asn Lys Asp Asp His Ser Ser
 20 25 30

Ala Lys Arg
 35

<210> 39

<211> 105

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 39

atgcttaaca ttgcgccgag ttgtgttttg gccagcggga tctctaagcc cgtgaccaag 60
 atggctagca cggagaacaa ggacgaccac agcagcgcca agagg 105

<210> 40

<211> 179

<212> PRT

<213> Vi khuẩn enterobacter cloacae

<400> 40

Met Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp
 20 25 30

Val Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp
 35 40 45

Gln Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val
 50 55 60

Leu Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro
 65 70 75 80

Ser Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro
100 105 110

Trp Gln Pro Ala Leu Cys Gly Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Glu Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu Ser Tyr Lys
165 170 175

Lys Ala Leu

<210> 41
<211> 178
<212> PRT
<213> Vi khuẩn pantoea ananatis

<400> 41

Met Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Gln Lys
1 5 10 15

Ile Ala Ser Ala Ile Ala Asp Glu Ile Lys Gly Gln Gln Ser Cys Asp
20 25 30

Val Ile Asn Ile Gln Asp Ala Lys Thr Leu Asp Trp Gln Gln Tyr Asp
35 40 45

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

Val Asn Glu Phe Val Lys His Asn Leu Leu Ala Leu Gln Gln Arg Val
65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
85 90 95

Ser Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Val Lys Phe Leu Ala Gln Ser Pro
100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Tyr Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Phe Ile Met Arg Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ala Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Gln Gln Val Gln Arg Phe Ala Arg Asp Phe Ala Gln Leu Pro Gly Lys
165 170 175

Ser Tyr

<210> 42

<211> 177

<212> PRT

<213> Vi khuẩn pantoea stewardii

<400> 42

Met Lys Ala Leu Ile Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Lys
1 5 10 15

Ile Ala Ser Ser Ile Ala Asp Val Ile Arg Gln Gln Gln Gln Cys Asp
20 25 30

Val Leu Asn Ile Lys Asp Ala Ser Leu Pro Asp Trp Ala Gln Tyr Asp
35 40 45

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

Val Asp Lys Phe Val Lys Gln His Leu His Glu Leu Gln Gln Arg Thr
65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Ser Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Gln Lys Phe Leu Ala His Ser Pro
 100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Tyr Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
 130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ser Thr Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Gln Gln Val Ser Thr Phe Ala Asn Asp Phe Ala Gln Leu Pro Gly Lys
 165 170 175

Ser

<210> 43
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> E. coli

<400> 43

Met Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Leu Gly Ile Gln Ala
 20 25 30

Asp Val Ala Asn Val His Arg Ile Glu Glu Pro Gln Trp Glu Asn Tyr
 35 40 45

Asp Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Tyr His Ser
 50 55 60

Ala Phe Gln Glu Phe Val Lys Lys His Ala Thr Arg Leu Asn Ser Met
 65 70 75 80

Pro Ser Ala Phe Tyr Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys
85 90 95

Arg Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Ala Arg Lys Phe Leu Met Asn Ser
100 105 110

Gln Trp Arg Pro Asp Arg Cys Ala Val Ile Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
115 120 125

Pro Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Lys Leu Ile Met Lys
130 135 140

Met Ser Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp
145 150 155 160

Trp Glu Gln Val Ala Asn Phe Ala Arg Glu Ile Ala His Leu Thr Asp
165 170 175

Lys Pro Thr Leu Lys
180

<210> 44
<211> 178
<212> PRT
<213> vi khuẩn erwinia toletana

<400> 44

Met Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Ser Arg Glu Gly Gln Thr Arg Glu
1 5 10 15

Ile Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Cys Asp
20 25 30

Val Phe Asn Ile Leu Arg Val Glu Gln Ile Asp Trp Ser Gln Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Leu Ile Gly Gly Ser Ile His Tyr Gly His Phe His Pro Ala
50 55 60

Val Ala Lys Phe Val Lys Arg His Leu His Glu Leu Gln Gln Arg Ser
65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Ala Asp Lys Arg
85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ala Tyr Met Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Pro
100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Thr
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Thr Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Glu Phe Ala His Leu Pro Gly Lys
165 170 175

Thr Gln

<210> 45
<211> 179
<212> PRT
<213> Vi khuẩn pectobacterium carotovorum

<400> 45

Met Lys Ala Leu Ile Val Phe Ser Ser Arg Asp Gly Gln Thr Arg Ala
1 5 10 15

Ile Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Thr Leu Lys Gly Thr Leu Glu Cys Asp
20 25 30

Val Val Asn Val Leu Asn Ala Asn Asp Ile Asp Leu Ser Gln Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Ala Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly Arg Phe His Pro Ala
50 55 60

Val Asn Gln Phe Ile Arg Lys His Leu Thr Ser Leu Gln Gln Leu Pro
65 70 75 80

Ser Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
85 90 95

Thr Ile Gln Thr Asn Ala Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro
100 105 110

Trp Gln Pro Asp Leu Cys Cys Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Ile
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ser Thr Lys Glu Ile Glu Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Gln Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Asp Phe Ala Gln Leu Ala Ala Lys
165 170 175

Asn Pro Ala

<210> 46
<211> 179
<212> PRT
<213> Vi khuẩn shimwellia blattae

<400> 46

Met Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Lys
1 5 10 15

Ile Ala Arg His Ile Ala Gly Val Leu Glu Glu Gln Gly Lys Ala Cys
20 25 30

Glu Leu Val Asp Leu Leu Gln Pro Gly Glu Pro Asp Trp Ser Thr Val
35 40 45

Glu Cys Val Val Leu Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Lys
50 55 60

Ser Phe Ile Arg Phe Val Asn Thr His Ala Gln Arg Leu Asn Asn Met
65 70 75 80

Pro Gly Ala Leu Phe Thr Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys
 85 90 95

Gln Ser Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Ala Ala Ser
 100 105 110

Pro Trp Gln Pro Gln Arg Cys Gln Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
 115 120 125

Pro Arg Tyr Ser Trp Tyr Asp Arg Met Met Ile Arg Leu Ile Met Lys
 130 135 140

Met Ala Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp
 145 150 155 160

Trp Gln Ser Val Thr Arg Phe Ala Arg Glu Ile Ala Gln Leu Pro Gly
 165 170 175

Glu Thr Arg

<210> 47
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Vi khuẩn pantoea stewardii

<400> 47

Met Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Ser Arg Asp Gly Gln Thr Gln Leu
 1 5 10 15

Ile Ala Ser Ser Ile Ala Lys Glu Leu Glu Gly Lys Gln Ala Cys Asp
 20 25 30

Val Leu Asn Ile Leu Asp Thr Thr Asn Val Glu Trp Thr Gln Tyr Asp
 35 40 45

Arg Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro Ala
 50 55 60

Val Ala Glu Phe Val Lys Arg His Gln Arg Glu Leu Gln Gln Arg Ser
 65 70 75 80

Ser Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Ser Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Ala Lys Phe Leu Asn Gln Ser Pro
 100 105 110

Trp Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Ile Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met
 130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Ser Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Gln Gln Val Thr Arg Phe Ala Gln Glu Phe Ala Arg Leu Pro Gly Lys
 165 170 175

Thr Ser

<210> 48
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Vi khuẩn enterobacter cloacae

<400> 48

Met Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Gly Ile Tyr Ala
 20 25 30

Asp Val Ile Asn Leu Asn Arg Thr Glu Glu Ile Ala Trp Gln Glu Tyr
 35 40 45

Asp Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro
 50 55 60

Ala Val Asp Arg Phe Val Lys Lys His Thr Glu Thr Leu Asn Ser Leu
 65 70 75 80

Pro Gly Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Ala Glu Lys
 85 90 95

Arg Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser
 100 105 110

Pro Trp Lys Pro Ala Ala Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
 115 120 125

Pro Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Arg Leu Ile Met Lys
 130 135 140

Met Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp
 145 150 155 160

Trp Ser Gln Val Ala Ser Phe Ala Arg Glu Ile Val Gln Leu Thr Arg
 165 170 175

Ser Ser Arg Leu
 180

<210> 49
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Vi khuẩn enterobacter mori

<400> 49

Met Lys Ile Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Ser Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Ala Phe Asp Val
 20 25 30

Asp Val Val Asn Leu His Arg Ala Glu Asn Ile Ala Trp Glu Glu Tyr
 35 40 45

Asp Gly Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Ser
 50 55 60

Thr Leu Asn Ser Phe Val Lys Lys His Gln Gln Ala Leu Lys Lys Leu
 65 70 75 80

Pro Gly Ala Phe Tyr Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys
85 90 95

Arg Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asp Ser
100 105 110

Pro Trp Gln Pro Asp Leu Ser Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr
115 120 125

Pro Arg Tyr Asn Trp Tyr Asp Arg Ile Met Ile Arg Leu Ile Met Lys
130 135 140

Ile Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp
145 150 155 160

Trp Gln Gln Val Thr His Phe Ala His Glu Ile Val Gln Leu Val Arg
165 170 175

Lys

<210> 50
<211> 178
<212> PRT
<213> Vi khuẩn enterobacter cloacae

<400> 50

Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala Ile
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp Val
20 25 30

Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Gln
35 40 45

Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val Leu
50 55 60

Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro Ser
65 70 75 80

Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
85 90 95

Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro Trp
100 105 110

Gln Pro Ala Leu Cys Gly Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro Arg
115 120 125

Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Glu
145 150 155 160

Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu Ser Tyr Lys Lys
165 170 175

Ala Leu

<210> 51
<211> 177
<212> PRT
<213> Vi khuẩn pantoea ananatis

<400> 51

Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Gln Lys Ile
1 5 10 15

Ala Ser Ala Ile Ala Asp Glu Ile Lys Gly Gln Gln Ser Cys Asp Val
20 25 30

Ile Asn Ile Gln Asp Ala Lys Thr Leu Asp Trp Gln Gln Tyr Asp Arg
35 40 45

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

Asn Glu Phe Val Lys His Asn Leu Leu Ala Leu Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Gly Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Ser
85 90 95

Pro Glu Thr Asn Ala Tyr Thr Val Lys Phe Leu Ala Gln Ser Pro Trp
100 105 110

Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Tyr Tyr Pro Arg
115 120 125

Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Phe Ile Met Arg Met Thr
130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Ala Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Gln
145 150 155 160

Gln Val Gln Arg Phe Ala Arg Asp Phe Ala Gln Leu Pro Gly Lys Ser
165 170 175

Tyr

<210>	52
<211>	180
<212>	PRT
<213>	E. coli

<400> 52

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu Ile
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Leu Gly Ile Gln Ala Asp
20 25 30

Val Ala Asn Val His Arg Ile Glu Glu Pro Gln Trp Glu Asn Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Tyr His Ser Ala
50 55 60

Phe Gln Glu Phe Val Lys Lys His Ala Thr Arg Leu Asn Ser Met Pro
65 70 75 80

Ser Ala Phe Tyr Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg
 85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Ala Arg Lys Phe Leu Met Asn Ser Gln
 100 105 110

Trp Arg Pro Asp Arg Cys Ala Val Ile Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
 115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Lys Leu Ile Met Lys Met
 130 135 140

Ser Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp Trp
 145 150 155 160

Glu Gln Val Ala Asn Phe Ala Arg Glu Ile Ala His Leu Thr Asp Lys
 165 170 175

Pro Thr Leu Lys
 180

<210> 53
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Vi khuẩn erwinia toletana

<400> 53

Lys Ala Leu Ile Leu Phe Ser Ser Arg Glu Gly Gln Thr Arg Glu Ile
 1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Cys Asp Val
 20 25 30

Phe Asn Ile Leu Arg Val Glu Gln Ile Asp Trp Ser Gln Tyr Asp Arg
 35 40 45

Val Leu Ile Gly Gly Ser Ile His Tyr Gly His Phe His Pro Ala Val
 50 55 60

Ala Lys Phe Val Lys Arg His Leu His Glu Leu Gln Gln Arg Ser Ser
 65 70 75 80

Gly Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Ala Asp Lys Arg Thr
85 90 95

Pro Gln Thr Asn Ala Tyr Met Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Pro Trp
100 105 110

Gln Pro Asp Cys Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Thr Arg
115 120 125

Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Thr
145 150 155 160

Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Glu Phe Ala His Leu Pro Gly Lys Thr
165 170 175

Gln

<210> 54
<211> 178
<212> PRT
<213> Vi khuẩn pectobacterium carotovorum

<400> 54

Lys Ala Leu Ile Val Phe Ser Ser Arg Asp Gly Gln Thr Arg Ala Ile
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Asn Thr Leu Lys Gly Thr Leu Glu Cys Asp Val
20 25 30

Val Asn Val Leu Asn Ala Asn Asp Ile Asp Leu Ser Gln Tyr Asp Arg
35 40 45

Val Ala Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly Arg Phe His Pro Ala Val
50 55 60

Asn Gln Phe Ile Arg Lys His Leu Thr Ser Leu Gln Gln Leu Pro Ser
65 70 75 80

Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
 85 90 95

Ile Gln Thr Asn Ala Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro Trp
 100 105 110

Gln Pro Asp Leu Cys Cys Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro Arg
 115 120 125

Tyr Arg Trp Phe Asp Arg Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Ile Thr
 130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Ser Thr Lys Glu Ile Glu Tyr Thr Asp Trp Gln
 145 150 155 160

Gln Val Ala Arg Phe Ala Gln Asp Phe Ala Gln Leu Ala Ala Lys Asn
 165 170 175

Pro Ala

<210> 55
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Vi khuẩn shimwellia blattae

<400> 55

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Lys Ile
 1 5 10 15

Ala Arg His Ile Ala Gly Val Leu Glu Glu Gln Gly Lys Ala Cys Glu
 20 25 30

Leu Val Asp Leu Leu Gln Pro Gly Glu Pro Asp Trp Ser Thr Val Glu
 35 40 45

Cys Val Val Leu Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Lys Ser
 50 55 60

Phe Ile Arg Phe Val Asn Thr His Ala Gln Arg Leu Asn Asn Met Pro
 65 70 75 80

Gly Ala Leu Phe Thr Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Ser Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Ala Ala Ser Pro
100 105 110

Trp Gln Pro Gln Arg Cys Gln Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Ser Trp Tyr Asp Arg Met Met Ile Arg Leu Ile Met Lys Met
130 135 140

Ala Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Gln Ser Val Thr Arg Phe Ala Arg Glu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu
165 170 175

Thr Arg

<210> 56
<211> 179
<212> PRT
<213> Vi khuẩn enterobacter cloacae

<400> 56

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu Ile
1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Gly Ile Tyr Ala Asp
20 25 30

Val Ile Asn Leu Asn Arg Thr Glu Glu Ile Ala Trp Gln Glu Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro Ala
50 55 60

Val Asp Arg Phe Val Lys Lys His Thr Glu Thr Leu Asn Ser Leu Pro
65 70 75 80

Gly Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Ala Glu Lys Arg
85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro
100 105 110

Trp Lys Pro Ala Ala Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Arg Leu Ile Met Lys Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Ser Gln Val Ala Ser Phe Ala Arg Glu Ile Val Gln Leu Thr Arg Ser
165 170 175

Ser Arg Leu

<210> 57
<211> 178
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 57

Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala Ile
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp Val
20 25 30

Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Gln
35 40 45

Val Leu Ile Gly Ala Asn Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val Leu
50 55 60

Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro Ser

65 70 75 80

Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
85 90 95

Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro Trp
100 105 110

Gln Pro Ala Leu Cys Gly Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro Arg
115 120 125

Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Glu
145 150 155 160

Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu Ser Tyr Lys Lys
165 170 175

Ala Leu

<210> 58
<211> 172
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 58

Lys Ala Leu Val Leu Tyr Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr His Ala Ile
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ile Ala Ser Cys Met Lys Glu Lys Ala Glu Cys Asp Val
20 25 30

Ile Asp Leu Thr His Gly Glu His Val Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Gln
35 40 45

Val Leu Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe Asn Ala Val Leu
50 55 60

Asp Lys Phe Ile Lys Arg Asn Val Asp Gln Leu Asn Asn Met Pro Ser
65 70 75 80

Ala Phe Phe Cys Val Asn Leu Thr Ala Arg Lys Pro Glu Lys Arg Thr
85 90 95

Pro Gln Thr Asn Pro Tyr Val Arg Lys Phe Leu Leu Ala Thr Pro Trp
100 105 110

Gln Pro Ala Leu Cys Gly Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro Arg
115 120 125

Tyr Arg Trp Ile Asp Lys Val Met Ile Gln Leu Ile Met Arg Met Thr
130 135 140

Gly Gly Glu Thr Asp Thr Ser Lys Glu Val Glu Tyr Thr Asp Trp Glu
145 150 155 160

Gln Val Lys Lys Phe Ala Glu Asp Phe Ala Lys Leu
165 170

<210> 59
<211> 179
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 59

Lys Thr Leu Ile Leu Phe Ser Thr Arg Asp Gly Gln Thr Arg Glu Ile
1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Ala Ser Glu Leu Lys Glu Gln Gly Ile Tyr Ala Asp
20 25 30

Val Ile Asn Leu Asn Arg Thr Glu Glu Ile Ala Trp Gln Glu Tyr Asp
35 40 45

Arg Val Val Ile Gly Ala Ser Ile Arg Tyr Gly His Phe His Pro Ala
50 55 60

Val Asp Arg Phe Val Lys Lys His Thr Glu Thr Leu Asn Ser Leu Pro
65 70 75 80

Gly Ala Phe Phe Ser Val Asn Leu Val Ala Arg Lys Ala Glu Lys Arg
85 90 95

Thr Pro Gln Thr Asn Ser Tyr Thr Arg Lys Phe Leu Leu Asn Ser Pro
100 105 110

Trp Lys Pro Ala Ala Cys Ala Val Phe Ala Gly Ala Leu Arg Tyr Pro
115 120 125

Arg Tyr Arg Trp Tyr Asp Arg Phe Met Ile Arg Leu Ile Met Lys Met
130 135 140

Thr Gly Gly Glu Thr Asp Thr Arg Lys Glu Val Val Tyr Thr Asp Trp
145 150 155 160

Ser Gln Ile Ala Ser Phe Ala Arg Glu Ile Val Gln Leu Thr Arg Ser
165 170 175

Ser Arg Leu

<210> 60
<211> 504
<212> PRT
<213> Cây amaranthus tuberculatus

<400> 60

Met Gly Asn Ile Ser Glu Arg Glu Glu Pro Thr Ser Ala Lys Arg Val
1 5 10 15

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Lys Leu
20 25 30

Lys Ser His Gly Leu Ser Val Thr Leu Phe Glu Ala Asp Ser Arg Ala
35 40 45

Gly Gly Lys Leu Lys Thr Val Lys Lys Asp Gly Phe Ile Trp Asp Glu
50 55 60

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ser Glu Ala Glu Val Ser Ser Leu Ile
 65 70 75 80

Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Leu Pro Ile Ser Gln Asn
 85 90 95

Lys Arg Tyr Ile Ala Arg Asp Gly Leu Pro Val Leu Leu Pro Ser Asn
 100 105 110

Pro Ala Ala Leu Leu Thr Ser Asn Ile Leu Ser Ala Lys Ser Lys Leu
 115 120 125

Gln Ile Met Leu Glu Pro Phe Leu Trp Arg Lys His Asn Ala Thr Glu
 130 135 140

Leu Ser Asp Glu His Val Gln Glu Ser Val Gly Glu Phe Phe Glu Arg
 145 150 155 160

His Phe Gly Lys Glu Phe Val Asp Tyr Val Ile Asp Pro Phe Val Ala
 165 170 175

Gly Thr Cys Gly Gly Asp Pro Gln Ser Leu Ser Met His His Thr Phe
 180 185 190

Pro Glu Val Trp Asn Ile Glu Lys Arg Phe Gly Ser Val Phe Ala Gly
 195 200 205

Leu Ile Gln Ser Thr Leu Leu Ser Lys Lys Glu Lys Gly Gly Glu Asn
 210 215 220

Ala Ser Ile Lys Lys Pro Arg Val Arg Gly Ser Phe Ser Phe Gln Gly
 225 230 235 240

Gly Met Gln Thr Leu Val Asp Thr Met Cys Lys Gln Leu Gly Glu Asp
 245 250 255

Glu Leu Lys Leu Gln Cys Glu Val Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Gln Lys
 260 265 270

Gly Ile Pro Ser Leu Gly Asn Trp Ser Val Ser Ser Met Ser Asn Asn
 275 280 285

Thr Ser Glu Asp Gln Ser Tyr Asp Ala Val Val Val Thr Ala Pro Ile
 290 295 300

Arg Asn Val Lys Glu Met Lys Ile Met Lys Phe Gly Asn Pro Phe Ser
 305 310 315 320

Leu Asp Phe Ile Pro Glu Val Thr Tyr Val Pro Leu Ser Val Met Ile
 325 330 335

Thr Ala Phe Lys Lys Asp Lys Val Lys Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly
 340 345 350

Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln His Asn Gly Leu Lys Thr Leu Gly
 355 360 365

Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ser Asp Met
 370 375 380

Cys Leu Phe Thr Thr Phe Val Gly Gly Ser Arg Asn Arg Lys Leu Ala
 385 390 395 400

Asn Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Ile Val Ser Ser Asp Leu Gln
 405 410 415

Gln Leu Leu Gly Thr Glu Asp Glu Pro Ser Phe Val Asn His Leu Phe
 420 425 430

Trp Ser Asn Ala Phe Pro Leu Tyr Gly His Asn Tyr Asp Ser Val Leu
 435 440 445

Arg Ala Ile Asp Lys Met Glu Lys Asp Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala
 450 455 460

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

Cys Lys Ala Ala Glu Leu Val Ile Ser Tyr Leu Asp Ser His Ile Tyr
 485 490 495

Val Lys Met Asp Glu Lys Thr Ala

500

<210> 61
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 61
 atgaaagcgc tgggtgctgta tagcacccgc gatggccaga cccatgcgat tgcgagctat 60
 attgcgagct gcatgaaaga aaaagcggaa tgcgatgtga ttgatctgac ccatggcgaa 120
 catgtgaacc tgaccagta tgatcaggtg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat 180
 tttaacgcgg tgctggataa atttattaaa cgcaacgtgg atcagctgaa caacatgccg 240
 agcgcgtttt tttgctgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcac cccgcagacc 300
 aaccgatatg tgcgcaaatt tctgctggcg acccgtggc agccggcgct gtgcggcggtg 360
 tttgcgggcg cgctgcgcta tccgcgctat cgctggattg ataaagtgat gattcagctg 420
 attatgcgca tgaccggcg cgaaaccgat accagcaaag aagtggaata taccgattgg 480
 gaacaggtga aaaaatttgc ggaagatttt gcgaaactga gctataaaaa agcgcgtg 537

<210> 62
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 62
 atgaaagcgc tgattctggt tagcacccgc gatggccaga cccagaaaat tgcgagcgcg 60
 attgcggatg aaattaaagg ccagcagagc tgcgatgtga ttaacattca ggatgcgaaa 120
 accctggatt ggcagcagta tgatcgcggtg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat 180
 tttcagccgg tgggtgaacga atttgtgaaa cataacctgc tggcgctgca gcagcgcggtg 240
 agcggctttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcag cccggaaacc 300
 aacgcgtata ccgtgaaatt tctggcgag agcccggtgg agccggattg ctgcgcgggtg 360
 tttgcgggcg cgctgtatta tccgcgctat cgctggtttg atcgcgatgat gattcagttt 420
 attatgcgca tgaccggcg cgaaaccgat gcgagcaaag aagtggaata taccgattgg 480

cagcaggtgc agcgctttgc gcgcgatttt gcgcagctgc cgggcaaaag ctat

534

<210> 63
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 63
 atgaaagcgc tgattctgta tagcaccgc gatggccaga cccgcaaaat tgcgagcagc 60
 attgcggatg tgattcgcca gcagcagcag tgcgatgtgc tgaacattaa agatgcgagc 120
 ctgccggatt gggcgagta tgatcgctg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat 180
 ttccagccgg tgggtggataa atttgtgaaa cagcatctgc atgaactgca gcagcgcacc 240
 agcggctttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcag cccggaaacc 300
 aacgcgtata cccagaaatt tctggcgcag agcccggtgg agccggattg ctgcgcggtg 360
 tttgcggggc cgctgtatta tccgcgctat cgctggtttg atcgctgat gattcagctg 420
 attatgcgca tgaccggcgg cgaaaccgat agcaccaaag aagtggaata taccgattgg 480
 cagcaggtga gcacctttgc gaacgatttt gcgcagctgc cgggcaaaag c 531

<210> 64
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> E. coli

<400> 64
 gtgaaaacat taattctttt ctcaacaagg gacggacaaa cgcgcgagat tgcctcctac 60
 ctggcttcgg aactgaaaga actggggatc caggcggatg tcgccaatgt gcaccgcatt 120
 gaagaaccac agtgggaaaa ctatgaccgt gtggtcattg gtgcttctat tcgctatggt 180
 cactaccatt cagcgttcca ggaatttgtc aaaaaacatg cgacgcggct gaattcgaatg 240
 ccgagcgctt tttactccgt gaatctgggt gcgcgcaaac cggagaagcg tactccacag 300
 accaacagct acgcgcgcaa gtttctgatg aactcgcaat ggcggtccga tcgctgcgcg 360
 gtcattgccg gggcgctgcg ttaccacgt tatcgctggt acgaccgttt tatgatcaag 420
 ctgattatga agatgtcagg cggtgaaacg gatacgcgca aagaagttgt ctataccgat 480
 tgggagcagg tggcgaattt cgcccgagaa atcgcccatt taaccgacaa accgacgctg 540

aaataa

<210> 65
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 65
 atgaaagcgc tgattctggt tagcagccgc gaaggccaga cccgcgaaat tgcgagctat 60
 attgcgaaca gcattaaaga agaaatggaa tgcgatgtgt ttaacattct gcgcgtggaa 120
 cagattgatt ggagccagta tgatcgctg ctgattggcg gcagcattca ttatggccat 180
 tttcatccgg cgggtggcgaa atttgtgaaa cgccatctgc atgaactgca gcagcgcagc 240
 agcggctttt ttgctgtaa cctgaccgcg cgcaaagcgg ataaacgcac cccgcagacc 300
 aacgcgtata tgcgcaaatt tctgctgcag agcccgtggc agccggattg ctgcgcggtg 360
 tttgcggggc cgctgcgcta taccgctat cgctggtttg atcgctgat gattcagctg 420
 attatgcgca tgaccggcgg cgaaaccgat accagcaaag aagtggaata taccgattgg 480
 acccaggtgg cgcgctttgc gcaggaattt gcgcatctgc cgggcaaaac ccag 534

<210> 66
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 66
 atgaaagcgc tgattgtggt tagcagccgc gatggccaga cccgcgcgat tgcgagctat 60
 attgcgaaca ccctgaaagg caccctggaa tgcgatgtgg tgaacgtgct gaacgcgaac 120
 gatattgata tgagccagta tgatcgctg gcgattggcg cgagcattcg ctatggccgc 180
 tttcatccgg cgggtgaacca gtttattcgc aaacatctga ccagcctgca gcagctgccg 240
 agcgcgtttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcac cattcagacc 300
 aacgcgtata cccgcaaatt tctgctgaac agcccgtggc agccggatct gtgctgcgtg 360
 tttgcggggc cgctgcgcta tccgcgctat cgctggtttg atcgctgat gattcagctg 420

attatgcgca ttaccggcgg cgaaaccgat agcaccaaag aaattgaata taccgattgg 480
 cagcaggtgg cgcgctttgc gcaggatttt gcgcagctgg cggcgaaaaa cccggcg 537

<210> 67
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 67
 atgaagacct tgatcctatt ctccaccagg gacggccaaa cacacaagat cgcaaggcac 60
 atcgcaggag tcctcgaaga gcaggggaag gcctgcgagt tggtcgatct gttacagccc 120
 ggcgaaccag actggagtac cgttgaatgc gtggttctag gggccagcat tagatatggt 180
 cacttccata agtctttcat caggttcgta aacactcacg cgcagcgctt gaataatatg 240
 ccaggcgccc ttttcacagt taacttagtc gcccgaaagc ccgagaagca gagtccacag 300
 acgaactctt acaccgcaa gtttctcgcc gcctcccctt ggcagccaca gcgatgcaa 360
 gttttcgcgg gcgctttgag gtaccctagg tactcgtggt acgacagaat gatgatacgt 420
 ttgataatga agatggccgg gggcgagact gacacaagga aggagggtga gtacactgac 480
 tggcagtcgg tgactcgggt cgcgagggag atcgctcagc tgccgggaga gacgcgg 537

<210> 68
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 68
 atgaaagcgc tgattctggt tagcagccgc gatggccaga cccagctgat tgcgagcagc 60
 attgcgaaag aactggaagg caaacaggcg tgcgatgtgc tgaacattct ggataccacc 120
 aacgtggaat ggaccagta tgatcgctg ctgattggcg cgagcattcg ctatggccat 180
 tttcatccgg cgggtggcgga atttgtgaaa cgccatcagc gcgaactgca gcagcgcagc 240
 agcggctttt ttagcgtgaa cctgaccgcg cgcaaaccgg aaaaacgcag cccggaaacc 300
 aacgcgtata ccgcgaaatt tctgaaccag agcccgtggc agccggattg ctgcgcggtg 360
 tttgcgggcg cgctgcgcta tccgcgctat cgctggtttg atcgcattat gattcagctg 420

attatgcgca tgaccggcgg cgaaaccgat agcagcaaag aagtggaata taccgattgg 480
 cagcaggtga cccgctttgc gcaggaattt gcgcgcctgc cgggcaaaac cagc 534

<210> 69
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 69
 atgaaaaccc tgattctggt tagcaccgc gatggccaga cccgcgaaat tgcggcgttt 60
 ctggcgagcg aactgaaaga acagggcatt tatgcggatg tgattaacct gaaccgcacc 120
 gaagaaattg cgtggcagga atatgatcgc gtggtgattg gcgcgagcat tcgctatggc 180
 cattttcatc cggcgggtgga tcgctttgtg aaaaaacata ccgaaaccct gaacagcctg 240
 ccgggcgcgt tttttagcgt gaacctggtg gcgcgcaaag cggaaaaacg caccgccgag 300
 accaacagct ataccgcaa atttctgctg aacagcccggt ggaaaccggc ggcgtgcgcg 360
 gtgtttgcgg gcgcgctgcg ctatccgcgc tatcgctggt atgatcgctt tatgattcgc 420
 ctgattatga aaatgaccgg cggcgaaacc gataccgcga aagaagtgggt gtataccgat 480
 tggagccagg tggcgagctt tgcgcgcgaa attgtgcagc tgaccgcgag cagccgcctg 540

<210> 70
 <211> 531
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 70
 atgaaaattc tgattctggt tagcaccgc gatggccaga cccgcgaaat tgcggcgagc 60
 ctggcgagcg aactgaaaga acagggcttt gatgtggatg tggatgaacct gcatcgcgcg 120
 gaaaacattg cgtgggaaga atatgatggc gtggtgattg gcgcgagcat tcgctatggc 180
 cattttcata gcacctgaa cagctttgtg aaaaaacatc agcaggcgct gaaaaaactg 240
 ccgggcgcgt tttatagcgt gaacctggtg gcgcgcaaac cggaaaaacg caccgccgag 300
 accaacagct ataccgcaa atttctgctg gatagcccggt ggcagccgga tctgagcgcg 360

gtgtttgctg ggcgctgctg ctatccgcgc tataactggg atgatcgcat tatgattcgc 420
 ctgattatga aaattaccgg cggcgaaacc gatacccgca aagaagtggg gtataccgat 480
 tggcagcagg tgacccattt tgcgcatgaa attgtgcagc tgggtgcgcaa a 531

<210> 71
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 71 60
 atgaaggcct tggactgtg ctgcagcgg gacggccaga cccacgcaat tgcttcatac
 atcgctcctt gcatgaagga gaaggccgaa tgcgacgtga tcgacctcac ccacggggag 120
 cacgtgaacc tcaccaata cgatcaggtg ctaatcgggtg cgagtattcg ttacggccac 180
 ttcaacgccg tgcttgacaa gttcatcaag agaaacgtgg atcagctgaa caacatgcca 240
 agcgcgttct tctgcgtaaa cctcacagca aggaagcccg agaagcgtag tcccagaca 300
 aacccttatg tccgaaaatt cttgcttgct acccctggc agcccgcggt gtgcggagtg 360
 ttgcgagggg cccttcggta cccgcgatac cgggtggatcg acaaggtgat gatccagcta 420
 ataatgcgga tgactggggg agagacagac acgagcaagg aggtcgagta cacggattgg 480
 gagcaggtta agaagttcgc ggaggatttt gcaaagctat cgtacaagaa ggccctctag 540

<210> 72
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 72 60
 atgaaggcct tgatcctggt ctctacacgc gacggacaga cacagaagat cgcattctgcc
 atcgctgatg agataaaggg gcagcaatcg tgcgacgtga ttaacatata ggatgccaaa 120
 accctcgact ggcagcagta cgaccgggta ctcatcggcg cctccattcg ttacgggcat 180
 ttccagcccg ttgtgaatga gtttgtcaag cacaacctct tggccctaca gcagagagtt 240
 tccggattct tctccgtgaa cttgacagcc cgaaagccag agaagcggag ccccgagact 300
 aacgcttata cagtcaaatt cttggcgcag tcaccctggc aaccggactg ctgcgctggt 360

tttgcggggg ccctgtacta cccacggtac cgggtggttcg ataggggtgat gatacagttc 420
 ataattgcgaa tgacggggggg agagaccgac gcatcgaaag aggtggagta cactgactgg 480
 cagcaggtgc agcgggttcgc gcgagacttc gcgcagttac cgggtaagtc ctactga 537

<210> 73
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 73
 atgaaggcgc tgatcttgta ctcaaccagg gacggtcaga ctcgcaagat tgcaagtagc 60
 attgcggacg tcatcaggca gcagcagcag tgcgacgtct taaacattaa agacgcatca 120
 cttcctgact gggcccaata tgaccgagtg ctcatcggag ctagcatccg ttacgggcat 180
 ttccagcccg ttgtagacaa gttcgtgaag cagcacttgc acgagcttca gcagcggacc 240
 tccggcttct tctccgtgaa cctgacggcg aggaagcctg aaaaaaggag cctgagacc 300
 aatgcctaca cccagaaatt cttggcgcac tccccttggc agcccgattg ctgtgccgtt 360
 ttcgcggggg ccctttacta cccaggtac cgttggttcg accgggtgat gatccagttg 420
 attatgcgca tgactgggtg agagaccgac tctaccaagg aagtggagta cactgactgg 480
 cagcaggtga gtaccttcgc caacgatttt gccagcttc caggcaagag ctaa 534

<210> 74
 <211> 546
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 74
 atgaagacct tgattctatt ctccacaagg gacggccaga ctagggagat cgcttcctac 60
 ctggccagcg agctaaagga gcttggcatt caggcagacg tggctaacgt gcaccgaatt 120
 gaggagccgc agtgggagaa ctacgatcgg gtcgtgatcg gcgccagcat ccggtatgga 180
 cactaccaca gcgcgttcca ggagttcgtg aaaaagcacg cgacccgtct gaatagcatg 240
 ccatcagcgt tctactcggc caacctcgtg gctcgtaagc ccgagaagcg gacacccag 300

accaactcgt atgccaggaa gttccttatg aactcgcagt ggcgaccgga ccgctgcgcg 360
 gtgatcgccg gtgcgctcag gtaccctcgt tatagggtgg acgacagggt tatgattaaa 420
 cttataatga aaatgagcgg cggagagacc gacaccagaa aagagggtgg ttacacagac 480
 tgggagcagg tagcaaaact cgctagggag attgctcacc tcaccgacaa gccgaccttg 540
 aagtaa 546

<210> 75
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 75 60
 atgaaggccc ttatactgtt cagttccaga gaaggccaga cgaggagat agcgagttac
 attgccaaact cgataaagga ggaaatggaa tgcgacgtgt tcaacatcct tcgtgtggag 120
 cagatcgact ggtctcaata cgaccgcgtc ctgatcgggg gctcgataca ctacggccat 180
 ttccaccag cgggtggcaaa atttgtcaag aggcacctcc atgagttgca acagaggtct 240
 tccggctttt tctgcgtcaa cctgacggcc aggaaggccg acaagcggac tccccagacc 300
 aatgcctaca tgagaaagtt cttgttgcag tccccatggc aaccgattg ctgcgcgctg 360
 tttgcggggg cccttaggta caccggttac aggtggttcg acagggtaat gattcagctg 420
 atcatgagga tgacgggcgg agagactgac acatcgaagg aggtggagta cacagactgg 480
 acgcaggtcg cccgcttcgc gcaggagttc gccatttgc ccggcaaaac tcagtga 537

<210> 76
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 76 60
 atgaaggctc ttatcgtatt ctcttcgagg gatggccaaa cccgagcgat cgcgtcttat
 attgctaata ccctcaaagg gaccctagag tgcgacgtcg tcaacgtcct caatgctaac 120
 gacattgatt tgagccagta cgaccgtgtg gccattggcg cctccattcg ctacgggagg 180
 ttccaccag ctgttaacca gtttatccgg aagcacctta cgagcctcca gcagctacca 240

tctgcgttct tctccgtgaa cctcacagct cggagcccg agaagaggac tatacaaacc 300
 aacgcgtaca ctaggaagtt tctactgaac tcgccgtggc agccggacct gtgctgcgtg 360
 ttcgcgggag cccttcgcta tcccgcgttac aggtgggttg accgagtgat gattcaactc 420
 ataatgcgca taacgggggg cgagacagac tccaccaagg agatcgagta caccgactgg 480
 cagcaggtcg cgcgattcgc ccaggatttt gcacagcttg ccgcaaagaa cccggcatga 540

<210> 77
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 77
 atgaagacct tgatcctatt ctccaccagg gacggccaaa cacacaagat cgcaaggcac 60
 atcgcaggag tcctcgaaga gcagggaag gcctgcgagt tggtcgatct gttacagccc 120
 ggccaaccag actggagtac cgttgaatgc gtcgttctag gggccagcat tagatatggt 180
 cacttccata agtctttcat caggttcgta aacactcacg cgcagcgctt gaataatatg 240
 ccaggcgccc ttttcacagt taacttagtc gcccgaaagc ccgagaagca gagtccacag 300
 acgaactctt acaccgcga gtttctcgcc gcctcccctt ggcagccaca gcgatgccaa 360
 gttttcgcgg gcgctttgag gtaccctagg tactcgtggc acgacagaat gatgatacgt 420
 ttgataatga agatggccgg gggcgagact gacacaagga aggaggttga gtacactgac 480
 tggcagtcgg tgactcgggt cgcgagggag atcgctcagc tgccgggaga gacgcggtag 540

<210> 78
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 78
 atgaaggccc taattttatt cagtagtagg gacggccaga cccagcttat agcatcgtct 60
 atcgccaagg agctcgaagg gaagcaggcg tgcgacgtgt tgaatatacct cgacacgact 120
 aatgtggagt ggaccagta cgaccgcgtg ctgattggag catccatccg gtacgggcac 180

tttcaccctg cggtcgccga gttcgtaaaag cgtcaccagc gagagctaca gcagagaagt 240
 agtggctttt tctctgtgaa cttgacggcc cgtaagccgg aaaagaggtc ccccgagact 300
 aacgcctata ccgccaagtt ccttaaccaa agtccatggc agcctgactg ttgcgctgtg 360
 ttcgctgggg ctttgcgata ccctcgggtac cgctgggttcg acagaattat gatccagcta 420
 atcatgcgga tgaactggggg tgagacagat tcttcaaagg aggtcgagta caccgactgg 480
 cagcagggtga cccgcttcgc gcaagagttc gccaggcttc cgggaaagac cagttga 537

<210> 79
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 79 60
 atgaagaccc taatactggt ctctacccgc gacgggcaga caaggagat cgccgcgttc
 cttgcctcgg agctgaagga gcaggggatt tacgctgacg tcataaacct taaccggacg 120
 gaggagatag cttggcagga gtatgataga gtcgtaatcg gggcgctgat ccgatacggg 180
 catttccacc ctgctgtcga ccgcttcgtg aagaagcaca cagagacact caactcactg 240
 cccggcgctt ttttctctgt aaaccttggt gcccggaag ccgagaagag aacgcgcgag 300
 acgaactcat acaccaggaa gttcctatta aacagcccgt ggaagccagc ggcttgcgag 360
 gtcttttgctg gggccctccg ctaccctaga taccgctggt acgacagggt catgatacga 420
 ctgattatga aaatgacagg cgggggagacg gatacccgaa aggaggtagt ctacactgac 480
 tggctgcagg tcgcgtcgtt tgccagagag atagtccagt tgaccaggtc atcgcgcttg 540
 tga 543

<210> 80
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 80 60
 atgaagatat taatcctttt ctccaccggt gacggccaaa cccgtgagat tgcggcgctc
 ttggcgctccg aactcaagga gcaggcattc gacgtggacg tcgtcaacct tcaccggggc 120

gagaacatcg catgggagga gtacgacggt gttgtcatcg gagcgtccat caggtaacggc 180
 cactttcata gtaccctgaa ctcatctgtc aagaagcatc agcaggctct taagaagctt 240
 cccggggctt tctacagcgt gaacctcgtc gcccgggaagc ctgagaagcg cacaccgcag 300
 accaatagct acacccgcaa gttcctcttg gattccccgt ggcagcccga cctttcagcc 360
 gtgttcgcgc gggcactcag gtaccctcgg tacaattggg acgaccgtat catgattaga 420
 cttatcatga agattacagg cggcgagact gataccagga aggaagtagt ctacacagac 480
 tggcagcagg tcaactcactt tgctcacgag atcgtccagc tcgtgcggaa gtag 534

<210> 81
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 81 60
 aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc
 gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac 120
 gtgaacctca cccaatacga tcagggtgcta atcgggtgcga gtattcggtta cggccacttc 180
 aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaaagc 240
 gcgtttctct gcgtaaacct cacagcaagg aagcccgcga agcgtactcc ccagacaaac 300
 ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc ccttggcagc ccgcgttgtg cggagtggtc 360
 gcagggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420
 atgcggatga ctggggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattgggag 480
 caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatcgt acaagaaggc cctctag 537

<210> 82
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 82 60
 aaggccttga tcctgttctc tacacgcgac ggacagacac agaagatcgc atctgccatc

gctgatgaga taaaggggca gcaatcgtgc gacgtgatta acatacagga tgccaaaacc 120
 ctogactggc agcagtacga ccgggtactc atcggcgccct ccattcgtta cgggcatttc 180
 cagcccgttg tgaatgagtt tgtcaagcac aacctcttgg ccctacagca gagagtttcc 240
 ggattcttct ccgtgaactt gacagcccga aagccagaga agcggagccc cgagactaac 300
 gcttatacag tcaaattctt ggcgcagtca ccctggcaac cggactgctg cgctgttttt 360
 gcggggggccc tgtactaccc acggtaccgg tggttcgata gggatgatgat acagttcata 420
 atgcgaatga cgggggggaga gaccgacgca tcgaaagagg tggagtacac tgactggcag 480
 caggtgcagc ggttcgcgcg agacttcgcg cagttaccgg gtaagtccta ctga 534

<210> 83
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 83
 aagaccttga ttctattctc cacaaggac ggccagacta gggagatcgc ttctacctg 60
 gccagcgagc taaaggagct tggcattcag gcagacgtgg ctaacgtgca ccgaattgag 120
 gagccgcagt gggagaacta cgatcgggtc gtgatcggcg ccagcatccg gtatggacac 180
 taccacagcg cgttccagga gtctgtgaaa aagcacgca cccgtctgaa tagcatgcc 240
 tcagcgttct actcgggtcaa cctcgtgggt cgtaagcccg agaagcggac accccagacc 300
 aactcgtatg ccaggaagtt cttatgaac tcgcagtggc gaccggaccg ctgcgcggtg 360
 atcgcgggtg cgctcaggta ccctcgttat aggtggtacg acaggtttat gattaaactt 420
 ataataaaaa tgagcggcgg agagaccgac accagaaaag aggtggttta cacagactgg 480
 gagcaggtag caaacttcgc tagggagatt gctcacctca ccgacaagcc gaccttgaag 540
 taa 543

<210> 84
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 84
aaggccctta tactgttcag ttccagagaa ggccagacga gggagatagc gagttacatt 60
gccaaactcga taaaggagga aatggaatgc gacgtgttca acatccttcg tgtggagcag 120
atcgactggg ctcaatacga ccgctcctg atcgggggct cgatacacta cggccatttc 180
caccagcgg tggcaaaatt tgtcaagagg cacctccatg agttgcaaca gaggtcttcc 240
ggctttttct gcgtcaacct gacggccagg aaggccgaca agcggactcc ccagaccaat 300
gcctacatga gaaagttctt gttgcagtcc ccatggcaac ccgattgctg cgccgtgttt 360
gcggggggccc ttaggtacac ccgttacagg tggttcgaca gggtaatgat tcagctgatc 420
atgaggatga cgggcggaga gactgacaca tcgaaggagg tggagtacac agactggacg 480
caggtcgccc gcttcgcga ggagttcgcc catttgcccg gcaaaactca gtga 534

<210> 85
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 85
aaggctctta tcgtattctc ttcgagggat ggccaaaccc gagcgatcgc gtcttatatt 60
gctaataccc tcaaaggagc cctagagtgc gacgtcgtca acgtcctcaa tgctaacgac 120
attgatttga gccagtacga ccgtgtggcc attggcgcct ccattcgcta cgggagggtc 180
caccagctg ttaaccagtt tatccggaag caccttacga gcctccagca gctaccatct 240
gcgtttcttct ccgtgaacct cacagctcgg aagcccgaga agaggactat acaaaccaac 300
gcgtacacta ggaagtttct actgaactcg ccgtggcagc cggacctgtg ctgctgtgtc 360
gcgggagccc ttcgctatcc ccgttacagg tggtttgacc gagtgatgat tcaactcata 420
atgcgcataa cggggggcga gacagactcc accaaggaga tcgagtacac cgactggcag 480
caggtcgcgc gattcgccca ggattttgca cagcttgccg caaagaaccc ggcattga 537

<210> 86
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 86
aagaccttga tcctattctc caccagggac ggccaaacac acaagatcgc aaggcacatc 60
gcaggagtcc tcgaagagca ggggaaggcc tgcgagttgg tcgatctggt acagcccggc 120
gaaccagact ggagtaccgt tgaatgcgtc gttctagggg ccagcattag atatggtcac 180
ttccataagt ctttcatcag gttcgtaaac actcacgcgc agcgcttgaa taatatgcca 240
ggcgcccttt tcacagttaa cttagtcgcc cgaaagcccg agaagcagag tccacagacg 300
aactcttaca cccgcaagtt tctcgccgcc tccccttggc agccacagcg atgccaagtt 360
ttcgcggggc ctttgaggta ccctaggtac tcgtggtacg acagaatgat gatacgtttg 420
ataatgaaga tggccggggg cgagactgac acaaggaagg aggttgagta cactgactgg 480
cagtcggtga ctcggttcgc gagggagatc gtcagctgc cgggagagac gcggtag 537

<210> 87
<211> 540
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 87
aagaccctaa tactgttctc taccgcgcac gggcagacaa gggagatcgc cgcgttcctt 60
gcctcggagc tgaaggagca ggggatttac gctgacgtca taaaccttaa ccggacggag 120
gagatagctt ggcaggagta tgatagagtc gtaatcgggg cgtcgatccg atacgggcat 180
ttccaccctg ctgtcgaccg cttcgtgaag aagcacacag agacactcaa ctactgccc 240
ggcgcccttt tctctgtaaa cttgttgcc cgaaagccg agaagagaac gccgcagacg 300
aactcatata ccaggaagtt cctattaaac agcccgtgga agccagcggc ctgcgcggtc 360
tttgctgggg ccctccgcta ccctagatac cgctggtacg acaggttcat gatacgactg 420
attatgaaaa tgacaggcgg ggagacggat acccgaaagg aggtagtcta cactgactgg 480
tcgcaggctc cgctgtttgc cagagagata gtccagttga ccaggtcac gcgcttgtga 540

<210> 88
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 88
aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc 60
gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac 120
gtgaacctca cccaatacga tcaggtgcta atcgggtgcga gtattcgta cggccacttc 180
aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaaagc 240
gcgtttcttct gcgtaaacct cacggcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac 300
ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc cctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc 360
gcagggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420
atgcggatga ctggggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattggggag 480
caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatcgt acaagaaggc cctctag 537

<210> 89
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 89
aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc 60
gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac 120
gtgaacctca cccaatacga tcaggtgcta atcgggtgcga atattcgta cggccacttc 180
aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaaagc 240
gcgtttcttct gcgtaaacct cacagcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac 300
ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc cctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc 360
gcagggggccc ttcggtaccc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata 420
atgcggatga ctggggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattggggag 480
caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatcgt acaagaaggc cctctag 537

<210> 90
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 90

```

aaggccttgg tactgtactc gacgcgggac ggccagaccc acgcaattgc ttcatacatc      60
gcctcctgca tgaaggagaa ggccgaatgc gacgtgatcg acctcaccca cggggagcac      120
gtgaacctca cccaatacga tcaggtgcta atcggtgcca gtattcgta cggccacttc      180
aacgccgtgc ttgacaagtt catcaagaga aacgtggatc agctgaacaa catgccaagc      240
gcgtttcttct gcgtaaacct cacagcaagg aagcccgaga agcgtactcc ccagacaaac      300
ccttatgtcc gaaaattctt gcttgctacc ccctggcagc ccgcgttggtg cggagtgttc      360
gcagggggccc ttcggtagcc gcgataccgg tggatcgaca aggtgatgat ccagctaata      420
atgcggatga ctggggggaga gacagacacg agcaaggagg tcgagtacac ggattgggag      480
caggttaaga agttcgcgga ggattttgca aagctatagt acaagaaggc cctctag      537

```

<210> 91

<211> 534

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 91

```

aaggccttga tcctgttctc tacacgcgac ggacagacac agaagatcgc atctgccatc      60
gctgatgaga taaaggggca gcaatcgtgc gacgtgatta acatacagga tgccaaaacc      120
ctcgactggc agcagtagca ccgggtactc atcgggcgct ccattcgta cgggcatttc      180
cagcccgttg tgaatgagtt tgtcaagcac aacctcttgg ccctacagca gagagtttcc      240
ggattcttct ccgtgaactt gacagccoga aagccagaga agcggagccc cgagactaac      300
gcttatacag tcaaattctt ggcgcagtca ccctggcaac cggactgctg cgctgttttt      360
gcggggggccc tgtactaccc acggtaccgg tggttcgata gggtagatgat acagttcata      420
atgcgaatga cgggggggga gaccgacgca tcgaaagagg tggagtacac tgactggcag      480
caggtgcagc ggttcgcgcg agacttcgcg cagttaccgg gtaagtccca ctga      534

```

<210> 92

<211> 540

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 92

```

aagaccctaa tactgttctc taccgcgcac gggcagacaa gggagatcgc cgcgttcctt      60
gcctcggagc tgaaggagca ggggatttac gctgacgtca taaaccttaa ccggacggag      120
gagatagctt ggcaggagta tgatagagtc gtaatcgggg cgtcgatccg atacgggcat      180
ttccaccctg ctgtcgaccg cttcgtgaag aagcacacag agacactcaa ctcaactgcc      240
ggcgcctttt tctctgtaaa ccttggttgc cggaagccg agaagagaac gccgcagacg      300
aactcataca ccaggaagtt cctattaaac agcccgtgga agccagcggc ctgcgcgggtc      360
tttgctgggg ccctccgcta ccctagatac cgctggtacg acaggttcat gatacgactg      420
attatgaaaa tgacaggcgg ggagacggat acccgaaagg aggtagtcta cactgactgg      480
tcgcagatcg cgtcgtttgc cagagagata gtccagttga ccaggtcatc gcgcttgtga      540

```

<210> 93

<211> 540

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 93

```

atgaaggcgc tcgtgctcta cagcacacgc gacggccaga ctcatgcatc cgcctcttac      60
atcgcgtcct gtatgaagga gaaggccgag tgcgacgtca tcgatctcac gcacggggag      120
cacgtgaatc ttacgcagta cgaccaagtg ctgataggcg cctctatccg ttacggccat      180
tttaacgccg tcttcgacaa attcatcaag cgcaatgtag accagctgaa caacatgccc      240
tccgcgttct tttgcgtgaa cctgacgggt cggaagcctg agaagcgaac acctcagacc      300
aaccatacgc tgcggaaatt cctactcgca acgcatggc agcccgcctt gtgcgggggtt      360
ttcgcagggg cgctacgcta tccgcgttac cgctggatcg ataaggtgat gatccagcta      420
ataatgcgca tgaccggcgg cgagacagac acatcgaagg aagtcgaata cacagactgg      480
gaacaggtga agaagtttgc agaggatttc gccaaagctct catacaaaaa ggcattgtga      540

```

<210> 94

<211> 537

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 94
 atgaaggcgc ttatactggt ctcgacacgc gacggtcaga cgcagaaaat cgcctcagcc 60
 atcgccgacg agatcaaggg ccagcagagc tgcgatgtga tcaatattca ggacgccaaa 120
 actctcgact ggcagcagta tgaccgcgtg ctcatggcg catcaatccg ctacgggcat 180
 ttccagccag tcgtcaatga gtttgtgaaa cataacctct tggcattgca gcagcgggtg 240
 tctggcttct tctccgtgaa ccttacagct agaaaaccag agaagcggtc gcccagact 300
 aacgcctaca ccgttaagtt ccttgccgag tcaccgtggc agcctgattg ctgcgcggtc 360
 ttgcgcgggg cactgtacta ccctcgatac cgggtggttg atagggtaat gatccagttc 420
 ataatgcgca tgaccggtgg ggagaccgac gcaagtaaag aagttgagta cacggattgg 480
 cagcaggtgc aaaggttcgc acgcgacttc ggcagctcc cgggcaagtc ttactga 537

<210> 95

<211> 534

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 95
 atgaaagccc tgatcctcta ttccaccagg gacggccaga cccgcaagat agcctcctcc 60
 atcgctgatg tcatccgcca gcagcagcag tgcgacgttt taaacattaa ggacgcttca 120
 ctgcctgatt gggcccagta tgaccgcgtc ctgatcggcg cgtcgattcg gtacggccac 180
 ttccagcctg tggttgacaa gttcgtcaag cagcacctgc atgagctgca gcagcgaact 240
 agcgggttct tcagtggtgaa cctgacagct agaaagcccg aaaagagatc cccagaaacc 300
 aacgcctata cgcagaaatt ccttgctcac tcaccctggc agcctgactg ttgtgccgtc 360
 ttgcggggcg ccttgacta tccccgctac cgctggttcg atagggtgat gatccagctg 420
 attatgagaa tgacggggagg ggagaccgat tcgaccaagg aggtagagta cactgactgg 480
 caacaggtgt caactttcgc aaacgacttc gcacaactac ccggttaagtc ttga 534

<210> 96

<211> 546

<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 96
atgaaaaccc taatactggt ctcgaccgc gacggccaga cgcgtgagat tgcgagctac 60
ctggcctccg agctcaagga gctggggatc caagccgatg tcgcgaacgt gcaccgcatt 120
gaggagccgc agtgggagaa ttacgatcgc gttgtgatag gggccagcat ccgctatggc 180
cactaccact cggcctttca ggagtttgta aagaaacacg ccacaagatt aaactccatg 240
cctagcgcct tctactccgt caaccttgtc gcgcgcaagc cggagaagcg gacacctcag 300
acgaactcct acgcgcggaa gttcctgatg aacagccagt ggcgcccgga cagatgtgct 360
gttattgcgg gagccctgag atacccgagg taccggtggt acgatagggt tatgattaaa 420
cttattatga agatgtctgg tggggagact gacaccagga aggaggtggt atatacagac 480
tgggagcagg tcgccaattt cgctcgggaa atcgcgcctc tgacagacaa gcctacactg 540
aagtag 546

<210> 97
<211> 537
<212> ADN
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Tái tổ hợp

<400> 97
atgaaggccc tgatcctctt tagctctagg gagggccaga cccgcgagat cgcgtcatat 60
atcgcgaatt ccataaagga ggagatggag tgcgatgtgt ttaacatcct taggggtggag 120
caaatagact ggtctcagta tgaccgtgtg ctcatagggg ggagcatcca ctacggccac 180
tttcacccgg ccgtggcgaa attcgtcaag cgacacctcc acgagcttca gcagcgctcc 240
tcagggttct tctgctcaa cctgacagca agaaaggcag ataaacgcac cccgcagacg 300
aacgcctaca tgaggaagtt cttctgcag tctccttggt agcccgattg ctgcgcggtg 360
ttcgccggtg cactgcgcta tacgcgctat agatggtttg atagagtcac gattcagctc 420
atcatgcgga tgaccggcgg ggaaacggat actagtaagg aggtggagta cacggactgg 480
accaggtgg cacgtttcgc ccaggagttt gcacatcttc ctgggaagac ccaatga 537

<210> 98
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 98
 atgaaggcgc taattgtgtt cagctccagg gatggccaga cgagggctat agcatcctat 60
 atcgccaata ccttgaaagg aacgctcgag tgtgacgtgg tcaacgtctt gaacgccaat 120
 gacattgacc tttcccagta cgaccgagtt gccataggcg cgtcgatccg ctacggggcga 180
 tttcaccctg cagtcaacca gtttatacgg aagcatttga cctcgctgca gcagctcccg 240
 tcagccttct tctctgtgaa tttaaccgcg cggaagcctg agaaacggac gatccaaaca 300
 aacgcctata cccgaaagtt cctcctgaac agcccatggc agccagacct gtgctgtgtc 360
 ttgcgcggcg cgttgcggta tccccgtac aggtggttcg atagagtgat gatccagctc 420
 atcatgagga tcaccggggg agagaccgat agtaccaagg agatcgagta cacggactgg 480
 cagcaggtgg ctgccttcgc ccaggacttc gctcagttgg ccgcaaagaa tccagcataa 540

<210> 99
 <211> 540
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 99
 atgaagacac tgatcctgtt ctcgactcga gatggccaga ctcataaaat tgcgcgccac 60
 attgcggggg tcctggagga gcagggcaaa gcggtgcgagc tcgtggactt actccagccc 120
 ggggagccgg actggagcac ggtggagtgc gtcgttctgg gcgcttccat acgttacggg 180
 catttccaca aaagtttcat ccggttcgtc aacacccacg ctcaacgggt gaacaacatg 240
 cctggcgcgc tattcactgt taacttagtg gtcgtaagc ccgagaagca gtctccgag 300
 actaactcct acacaaggaa atttctagca gcaagcccat ggcaaccgca gcggtgccag 360
 gtgttcgctg gagctctgcg ctatcctagg tacagttggc acgacagaat gatgatacgg 420
 ttgattatga agatggcagg cggggagacg gacaccagga aagaggtcga atacactgac 480
 tggcaatcag tcaactcgggt tgctagagag atcgcgcaat taccaggtga gacgcggtaa 540

<210> 100
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 100
 atgaaggctc tcatactggt cagctcgaga gacgggcaga cccagctgat cgcctcctcc 60
 atagcaaagg agctagaggg caagcaagcc tgcgacgtgc tcaatattct cgacacaacc 120
 aacgtggagt ggactcagta cgacagagtc ctaatcggcg cgtccatcag atacggccac 180
 ttccatcccg ccgtcgctga attcgtgaaa cgccaccagc gtgagctcca gcagcgcagc 240
 agcggcttct tcagcgtgaa tcttactgcg agaaagccgg aaaagcggag tcccagagact 300
 aacgcttata cggcaaagtt cctcaaccaa tctccctggc aaccagactg ctgtgccgtg 360
 ttcgctgggg cactgaggtg tccgcgctat cggtggttcg atagaatcat gatacagctg 420
 ataatgcgta tgactgggtg ggagacggat tccagtaaag aggtagagta tactgattgg 480
 cagcaggtca ctaggttcgc gcaggagttt gctaggctgc cgggcaagac atcctga 537

<210> 101
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Trình tự Nhân tạo

<220>
 <223> Tái tổ hợp

<400> 101
 atgaaaacct taatcttggt cagcàcccg c gacggccaga cgcgtgaaat cgcagcggtc 60
 ctgcgttcgg agctcaagga acagggaatt tacgccgacg tcattaacct aaaccgtacc 120
 gaagagattg cgtggcagga gtatgaccgc gtggtgattg gcgcttctat ccgctatggc 180
 cacttccacc cggctgttga ccggttcgtg aagaagcaca cggagacctt gaactcactg 240
 ccggggggcat tcttttagcgt aaatctggtg gcgcgcaagg ccgagaagcg cccccccag 300
 acgaacagct acaccgcaa atttttactt aactccccat ggaaacctgc ggctgcgca 360
 gtgttcgcag gagctctccg ctatcctcgc tatcgatggt acgatcgggt catgattcgg 420
 ctgattatga aatgacggg cggcgagacg gatacgcgaa aggaagttgt ctacactgac 480

tggtcccagg tggcctcggt tgcaagggag atcgtagcgc tcactcgatc tagtaggctc 540

tga 543

<210> 102

<211> 534

<212> ADN

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Tái tổ hợp

<400> 102
atgaagattc tcatcttatt ttccacccga gacggccaaa cccgcgagat tgcggcgctcc 60

ctcgcctccg agttgaagga gcaggcggtt gatgtggatg tggccaacct ccaccgcgca 120

gaaaacatag cgtgggagga gtacgatggg gtgcgtcatcg gagcgtcaat ccgctacgga 180

catttccact caacgctgaa ttcatctgtg aagaagcacc aacaagcgct caagaagctg 240

cccgagcat tctacagcgt caacctcgtg gctcggaagc cggaaaagcg caccgccgaa 300

acaaacagct acacacgcaa gtttctgctc gactcgccct ggcaaccgga cctgagtgcc 360

gttttcgcgcg gggcactgcg ctatccccgt tacaactggt acgatcgcat aatgattcga 420

ctgatcatga agattacagg cggggaaacc gatactcgga aggaggtggt gtatacagac 480

tggcagcagg ttaccactt cgcccacgag atcgccagc tcgttcgtaa gtga 534