



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

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

(11)



1-0038834

(51)⁷ C12N 9/02; C12N 1/19; C12N 15/63;
C12N 1/15; C12N 15/53

(13) B

(21) 1-2018-05622

(22) 15/06/2017

(86) PCT/KR2017/006276 15/06/2017

(87) WO 2017/217794 21/12/2017

(30) 10-2016-0075357 16/06/2016 KR

(45) 26/02/2024 431

(43) 27/05/2019 374A

(73) FARMHANNONG CO., LTD. (KR)

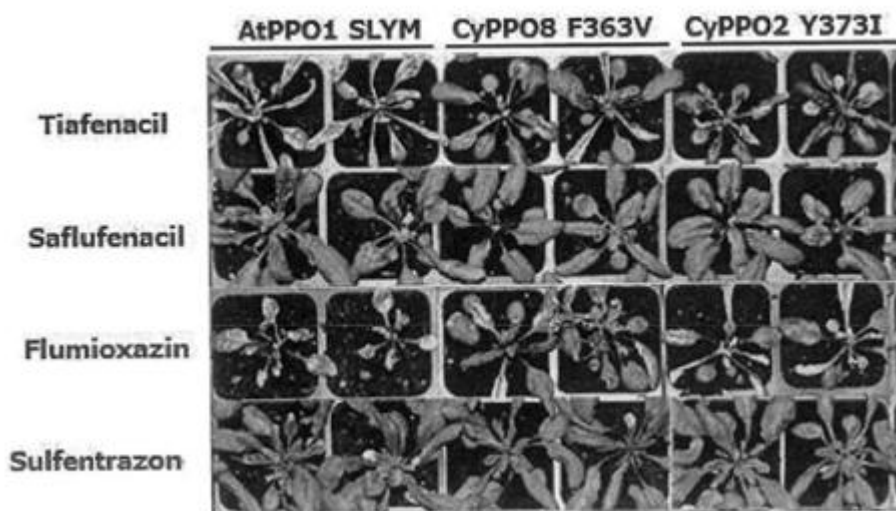
24, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu, Seoul 07320, Republic of Korea

(72) SUNG, Soon-Kee (KR); YOON, Joonseon (KR); AHN, Young Ock (KR); HAN, Yunjung (KR); HONG, Myoung-Ki (KR); PARK, Joonghyuk (KR).

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

(54) POLYPEPTIT BIẾN THỂ CỦA PROTOPORPHYRINOGEN OXIDAZA, CHẾ PHẨM TẠO RA VÀ/HOẶC TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU THUỐC DIỆT CỎ CỦA CÂY TRỒNG CHỨA POLYPEPTIT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CỎ ĐẠI

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra khả năng chống chịu được tăng cường và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tảo sử dụng biến thể axit amin của protoporphyrinogen oxidaza thu được từ sinh vật chưa có nhân. Sáng chế cũng đề xuất polypeptit biến thể của protoporphyrinogen oxidaza và chế phẩm tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng chứa polypeptit này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến protoporphyrinogen oxidaza thu được từ sinh vật chưa có nhân, hoặc biến thể của nó, và phương pháp tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tảo sử dụng enzym này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Con đường sinh tổng hợp porphyrin hoạt động để tổng hợp chất diệt lục và hem đóng vai trò thiết yếu trong quá trình trao đổi chất của cây, và nó diễn ra ở lục lạp. Trong con đường này, protoporphyrinogen IX oxidaza (sau đây, được gọi là PPO; EC:1,3,3,4) xúc tác quá trình oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX. Sau quá trình oxy hóa protoporphyrinogen IX thành protoporphyrin IX, protoporphyrin IX liên kết với magiê bằng Mg-chelatase để tổng hợp chất diệt lục, hoặc nó liên kết với sắt bằng Fe-chelatase để tổng hợp hem.

Do đó, khi hoạt tính PPO được ức chế, quá trình tổng hợp chất diệt lục và hem được ức chế và cơ chất protoporphyrinogen IX bỏ con đường sinh tổng hợp porphyrin thông thường, dẫn đến xuất nhanh protoporphyrinogen IX từ lục lạp đến tế bào chất, và sự tích lũy bào chất protoporphyrin IX do quá trình oxy hóa. Protoporphyrin IX được tích lũy tạo ra oxy đơn bội có độ phản ứng cao ($^1\text{O}_2$) khi có mặt ánh sáng và phân tử oxy mà phá hủy màng tế bào và nhanh chóng dẫn đến sự chết tế bào ở cây trồng. Trên cơ sở nguyên tắc này, thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính PPO đã được phát triển. Cho tới nay, đã có 9 họ thuốc diệt cỏ ức chế PPO, bao gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphthalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinedion, và các thuốc diệt cỏ khác, được phân loại theo cấu trúc hóa học của chúng.

Ngoài ra, để ngăn ngừa ảnh hưởng của thuốc diệt cỏ này với sự sinh trưởng của cây trồng trong khi sử dụng thuốc diệt cỏ, cần tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cho cây trồng.

Trong khi đó, tảo là sinh vật quang hợp có thể chuyển hóa năng lượng ánh sáng

thành hóa năng mà có thể được sử dụng để tổng hợp nhiều hợp chất hữu ích khác nhau. Ví dụ, tảo có thể cố định cacbon bằng cách quang hợp và chuyển hóa cacbon dioxit thành đường, tinh bột, lipid, mỡ, hoặc các phân tử sinh học khác, do đó loại bỏ khí nhà kính khỏi khí quyển. Ngoài ra, trồng tảo quy mô lớn tảo có thể tạo ra các loại cơ chất khác nhau như enzym công nghiệp, hợp chất trị liệu và protein, dưỡng chất, chất thương mại và chất đốt.

Tuy nhiên, trong trường hợp trồng tảo quy mô lớn tảo ở thiết bị phản ứng sinh học hoặc ở hồ để hở hoặc được bao quanh, sự nhiễm tạp có thể xảy ra bởi sinh vật cạnh tranh không mong muốn, ví dụ, tảo, nấm, luân trùng, hoặc động vật phù du không mong muốn.

Do đó, cần công nghệ để thu hoạch cây trồng và/hoặc tảo mong muốn với quy mô lớn bằng cách xử lý thuốc diệt cỏ ở nồng độ mà sẽ ức chế sự sinh trưởng của sinh vật cạnh tranh không có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, sau đó tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cho cây trồng và/hoặc tảo mong muốn.

Tài liệu tham khảo

(Tài liệu sáng chế 1) Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số công bố US 6,308,458 (2001.10.30)

(Tài liệu sáng chế 2) Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số công bố US 6,808,904 (2004.10.26)

(Tài liệu sáng chế 3) Đơn đăng ký sáng chế Mỹ số công bố US 7,563,950 (2009.07.21)

(Tài liệu sáng chế 4) Công bố đơn sáng chế quốc tế (2011.07.14)

(Tài liệu không phải sáng chế 1) Li X, Volrath SL., Chilcott CE, Johnson MA, Ward ER, Law MD, Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for *agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of maize. Plant physiology 133:736-747, 2003

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Trong bản mô tả này, tìm thấy là gen PPO loại hemY thu được từ sinh vật chưa

có nhân và thể đột biến của nó thể hiện khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ chính với thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza (PPO), và do đó đề xuất liệu việc cung cấp cây trồng và/hoặc tảo có gen này, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được tạo ra và/hoặc được tăng cường hay không.

Một phương án đề xuất biến thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm:

(1) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 1 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của polypeptit của SEQ ID NO: 1 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO) được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc

(2) trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (1).

Một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 1, có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm S63, P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353, và Y373, của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

Phương án khác đề xuất biến thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm:

(1) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 3 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của polypeptit của SEQ ID NO: 3 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO) được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc

(2) trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (1).

Một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 3, có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, và R465, của trình tự axit amin của SEQ ID NO:

3.

Phương án khác đề xuất biến thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm:

(1) trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 5 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của polypeptit của SEQ ID NO: 5 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO), được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc

(2) trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin (1).

Một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 5, có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, và F363, của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5.

Phương án khác đề xuất polynucleotit mã hóa biến thể polypeptit, hoặc polypeptit của SEQ ID NO: 1, 3, hoặc 5.

Phương án khác đề xuất vector tái tổ hợp chứa polynucleotit.

Phương án khác đề xuất tế bào (được biến nạp) tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp.

Phương án khác đề xuất chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm:

polypeptit của SEQ ID NO: 1, polypeptit của SEQ ID NO: 3, polypeptit của SEQ ID NO: 5, biến thể của polypeptit, và polypeptit có trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với polypeptit hoặc biến thể;

polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể;

vector tái tổ hợp chứa polynucleotit; và

tế bào (được biến nạp) tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp.

Thuốc diệt cỏ có thể là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ

nhóm gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphthalimit, phenyleste, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinedion và các thuốc diệt cỏ khác, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm butafenacil, saflufenacil, benzfendizon, tiafenacil, fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, acifluorfen, bifenox, etoxyfen, lactofen, chlometoxyfen, chlorintrofen, fluoroglycofen-etyl, halosafen, pyraflufen-etyl, fluazolat, flumioxazin, cinidon-etyl, flumiclorac-pentyl, fluthiacet, thidiazimin, oxadiargyl, oxadiazon, carfentrazon, sulfentrazon, azafenidin, pentoxazon, pyraclonil, flufenpyr-etyl, profluazol, phenopylat (2,4-diclophenyl 1-pyrolidincarboxylat), chất tương tự cacbamat của phenopylat (ví dụ, O-phenylpyrolidino- và chất tương tự piperidinocacbamat (tham chiếu “Ujjana B. Nandihalli, Mary V. Duke, Stephen O. Duke, Relationships between molecular properties and biological activities of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(10) 1993-2000”)), muối được chấp nhận dùng trong nông nghiệp của nó, và tổ hợp của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Cây trồng có nghĩa là sinh vật nhân chuẩn đa bào có khả năng quang hợp, có thể là cây một lá mầm hoặc cây hai lá mầm, và có thể là cây thảo mộc hoặc cây lấy gỗ. Tảo có nghĩa là sinh vật đơn bào có khả năng quang hợp, có thể là tảo không nhân hoặc tảo có nhân.

Theo một phương án, cây trồng và tảo được thao tác gen để còn chứa polypeptit có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó, và phạm vi lớn hơn của khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được tạo ra và/hoặc được tăng cường. Cây trồng và tảo được thao tác gen để chứa polypeptit có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó có thể được chuẩn bị bằng cách sử dụng chế phẩm để tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ trong đó còn chứa polypeptit có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó. Vì vậy, chế phẩm để tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể còn chứa polypeptit có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế phân bào, thuốc diệt cỏ ức chế quang hợp, thuốc diệt cỏ ức chế tổng hợp axit amin, thuốc

diệt cỏ ức chế plastit, và thuốc diệt cỏ ức chế màng tế bào, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi glyphosat, glufosinat, dicamba, 2,4-D (2,4-Diclophenoxyaxetic axit), isoxaflutol, thuốc diệt cỏ ức chế ALS (axetolactat synthaza), thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II, thuốc diệt cỏ gốc phenylure, thuốc diệt cỏ gốc bromoxynil, và tổ hợp của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm EPSPS (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza kháng glyphosat), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza hoặc glyphosat decarboxylaza) chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat; PAT (phosphinothricin-N-axetyltransferaza) chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat; DMO (dicamba monooxyaza) chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba; 2,4-D monooxyaza hoặc AAD (aryloxyalkanoat dioxyaza) chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D; ALS (axetolactat Synthaza), AHAS (axetohydroxyaxit synthaza), hoặc athahasl (axetohydroxyaxit synthaza cấu trúc dưới phân tử lớn) chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS; hệ thống quang hóa II protein D1 chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II; cytochrom P450 chống chịu thuốc diệt cỏ gốc phenylure; HPPD chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế plastit (hydroxylphenylpyruvat dioxyaza); nitrilaza chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, gen mã hóa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm gen chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat cp4 epsps, mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 hoặc gat4621; gen chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat bar, pat hoặc pat (SYN); gen chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba dmo; gen chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D AAD-1, AAD-12; ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, SurA hoặc SurB chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS; gen chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II psbA; gen chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure CYP76B1; gen chống chịu thuốc diệt cỏ isoxaflutol HPPDPF W336 và gen chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil bxn; và tổ hợp của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Phương án khác đề xuất thể biến nạp của cây trồng và/hoặc tảo có khả năng chống

chịu thuốc diệt cỏ, được biến nạp với polynucleotit, hoặc dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó.

Phương án khác đề xuất phương pháp chuẩn bị cây trồng chuyển gen hoặc tạo chuyển gen có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, bao gồm bước biến nạp cây trồng và/hoặc tạo với polynucleotit.

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tạo, bao gồm bước biến nạp cây trồng và/hoặc tạo với polynucleotit hoặc gen mã hóa của nó.

Việc biến nạp có thể được thực hiện trên tảo, và/hoặc cây trồng tế bào, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây.

Thể biến nạp có thể là tảo, và/hoặc cây trồng tế bào, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây.

Phương án khác đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt bao gồm:

bước cung cấp cho đất trồng trọt cây trồng chứa một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm polypeptit của SEQ ID NO: 1, 3, hoặc 5, hoặc biến thể polypeptit, polynucleotit mã hóa của nó, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp; và

bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt (hoặc cây trồng).

Theo phương án cụ thể, bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt có thể được thực hiện bằng cách sử dụng liều lượng có hiệu quả hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza lần lượt hoặc đồng thời.

Theo phương án khác, cây trồng có thể được thao tác gen để còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa polypeptit này, và liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được sử dụng lần lượt hoặc đồng thời.

Phương án khác đề xuất phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong

muốn khỏi môi trường nuôi trồng, bao gồm bước cung cấp môi trường nuôi trồng có tảo chứa một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm polypeptit, biến thể polypeptit, polynucleotit mã hóa polypeptit hoặc biến thể polypeptit, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

Giải pháp kỹ thuật

Sáng chế đề xuất công nghệ tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, ‘tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo’ hoặc ‘tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo’ được hiểu là tạo ra khả năng chống chịu ở cây trồng hoặc tảo mà không có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng hoặc tảo mà có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc nghĩa chính bao gồm cả hai.

Khi được sử dụng trong bản mô tả, ‘gồm trình tự,’ ‘gồm chủ yếu là trình tự,’ hoặc ‘chứa trình tự’ được sử dụng để chỉ cả hai trường hợp chứa trình tự được mô tả, hoặc cần chứa trình tự, và có thể được hiểu nghĩa là chứa trình tự khác với trình tự được mô tả và/hoặc chứa đột biến (bổ sung, làm khuyết và/hoặc thay thế axit amin hoặc axit nucleic), miễn là duy trì được hoạt tính bên trong của protein, polypeptit, hoặc axit nucleic phân tử và thể hiện chức năng dự định.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến một hoặc nhiều biến thể polypeptit được chọn từ nhóm gồm

biến thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 1 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của SEQ ID NO: 1 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO), được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó;

biến thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm trình tự axit amin trong đó

một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 3 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của SEQ ID NO: 3 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO), được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó;

biên thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 5 (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết của SEQ ID NO: 5 tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO), được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu ở vị trí tương ứng, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó; và

tổ hợp của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất polynucleotit mã hóa biên thể polypeptit, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, và tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp. Polynucleotit có thể được thiết kế sao cho codon được tối ưu hóa có trong tế bào cần được biến nạp trong codon mã hóa mỗi axit amin. Codon được tối ưu hóa có thể dễ dàng đã được biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực này (ví dụ, tham chiếu đến "<http://www.genscript.com/codon-opt.html>", "<http://sg.idtdna.com/CodonOpt>" v.v.).

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm biên thể polypeptit, polynucleotit mã hóa polypeptit, vector tái tổ hợp chứa polynucleotit, tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp, và tổ hợp của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất thể biến nạp có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, được biến nạp với polynucleotit.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp chuẩn bị cây trồng chuyển gen hoặc tảo chuyển gen có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, bao gồm bước biến nạp tảo, hoặc cây trồng tế bào, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây bằng polynucleotit.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, bao gồm bước biến nạp tảo, hoặc cây trồng tế bào, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây bằng polynucleotit.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn.

Polypeptit của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, 3, 5, hoặc biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả là protein PPO thu được từ sinh vật chưa có nhân điển hình (ví dụ, cyanobacteria), và là protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Cụ thể là, protein PPO mà thu được từ *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112 được đề xuất, và nó được chỉ định dưới dạng CyPPO2, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1, và trình tự nucleotit của gen mã hóa của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2. Ngoài ra, PPO thu được từ chủng *Lyngbya* sp. PCC 8106 được đề xuất, và nó được chỉ định dưới dạng CyPPO4, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3, và trình tự nucleotit của gen mã hóa của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4. Ngoài ra, PPO thu được từ chủng *Halotheca* sp. PCC 7418 được đề xuất, và nó được chỉ định dưới dạng CyPPO8, và trình tự axit amin của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5, và trình tự nucleotit của gen mã hóa của nó được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6. Trong bản mô tả, polypeptit và biến thể của polypeptit được mô tả ở trên có thể được biểu hiện lần lượt dưới dạng protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Ngoài ra, khi được sử dụng trong bản mô tả, “PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó” có thể được sử dụng để chỉ protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ ở trên hoặc biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, gen mã hóa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc gen mã hóa biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc tất cả chúng.

Protein PPO thu được từ cyanobacteria có thể có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO được tăng cường và/hoặc bằng cách chứa đột biến (biến dị) axit amin trong phạm vi duy trì được hoạt tính enzym hơn protein PPO kiểu dại. Đột biến axit amin này có thể bao gồm sự thay thế, làm khuyết, bổ sung và/hoặc đưa vào một hoặc nhiều loại axit amin được chọn từ các gốc axit amin của vị trí tương tác giữa protein PPO và thuốc diệt cỏ.

Biến thể protein PPO sẽ được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Một phương án đề xuất biến thể polypeptit chứa, gồm chủ yếu là, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 1 (CyPPO2) (ví dụ, axit amin được định vị ở vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit của SEQ ID NO: 1), được xóa hoặc được thế lần lượt độc lập bằng axit amin khác, khác với axit amin ban đầu (cụ thể, axit amin ở vị trí tương ứng của kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Gốc axit amin của polypeptit của SEQ ID NO: 1, được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu (ví dụ, một hoặc nhiều gốc được chọn từ nhóm gồm axit amin được định vị trên vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit của SEQ ID NO: 1), có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm S63 (nghĩa là “S(Ser) ở vị trí thứ 63”; sự biểu hiện của các gốc axit amin sau đây được hiểu theo cùng một cách), P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353, và Y373 trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án cụ thể, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm S63, P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353, và Y373 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1 được xóa hoặc được thế lần lượt và độc lập bằng axit amin mà được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng ở kiểu đại (ví dụ, được thế bằng axit amin mà được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng ở kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Ví dụ, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm Y373M (nghĩa là “gốc axit amin ở vị trí thứ 373 được thế từ Y(Tyr) đến M(Met)”); sự biểu hiện của đột biến axit amin sau đây được hiểu theo cùng một cách), Y373V, Y373I, Y373T, Y373L, Y373C, F169A, A175C, A175L, A175I, P316A, P316L, V318M, V318T, V318L, G351A, S63T, P91L, R92A, V173S, V173C, V173T, V173L, E228A, L229F, F337V, L340T, L340I, L340V, T352V, I353T, I353L, I353V, và I353C, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1; hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Ví dụ, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm đột biến axit amin của Y373M, Y373V, Y373I, Y373T, Y373L, Y373C, F169A, A175C, A175L, A175I, P316A, P316L, V318M, V318T, V318L, G351A, S63T, P91L, R92A, V173S, V173C, V173T, V173L, E228A, L229F, F337V, L340T, L340I, L340V, T352V, I353T, I353L, I353V, I353C, S63T+Y373M (nghĩa là thể đột biến hoặc đột biến chứa tất cả sự thay thế của gốc thứ 63 từ S đến T và sự thay thế của gốc thứ 373 từ Y đến M; sự biểu hiện của hai hoặc nhiều hơn hai đột biến axit amin sau đây được hiểu theo cùng một cách), R92A+Y373M, V173S+Y373M, V173S+Y373I, V173S+Y373L, V173S+Y373V, V173C+Y373M, V173C+Y373I, V173T+Y373M, V173T+Y373I, V173L+Y373M, A175L+Y373M, A175L+Y373I, A175C+Y373M, A175C+Y373I, A175I+Y373M, E228A+Y373M, L229F+Y373T, V318M+Y373M, V318M+Y373I, V318M+Y373V, V318T+Y373I, L340I+Y373M, L340I+Y373I, L340V+Y373M, G351A+Y373M, I353T+Y373M, I353T+Y373I, I353T+Y373L, I353L+Y373M, I353V+Y373M, I353C+Y373M, S63T+V173S+Y373M, S63T+V173S+Y373I, S63T+I353T+Y373M, S63T+I353T+Y373I, V173S+V318M+Y373M, V173T+L340I+Y373M, V173S+A175C+Y373M, A175C+V318M+Y373M, A175L+V318M+Y373M, A175C+I353L+Y373M, A175C+I353V+Y373M, P316A+V318L, P316L+V318L, F337V+Y373M, T352V+Y373M, G351A+T352V+Y373M, và P91L+Y373M, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1, hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Phương án khác đề xuất biến thể polypeptit chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 3 (CyPPO4) (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit của SEQ ID NO: 3), được xóa hoặc được thế lần lượt và độc lập bằng khác axit amin mà khác với axit amin ban đầu (cụ thể, axit amin ở vị trí tương ứng của kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Gốc axit amin của polypeptit của SEQ ID NO: 3 mà được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu (ví dụ, một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin được định vị trên vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit của SEQ ID NO: 3) có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, và R465, ví dụ, một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm A176, P318, V320, và Y375, của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án cụ thể, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, và R465, ví dụ, một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm A176, P318, V320, và Y375, của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 được xóa hoặc được thế lần lượt và độc lập bằng axit amin mà được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng ở kiểu đại (ví dụ, được thế bằng axit amin mà được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile),

T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng ở kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Ví dụ, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm Y375M, Y375V, Y375I, Y375T, Y375C, A176C, A176L, P318L, V320L, V320M, và P318A, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3, hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Cụ thể hơn, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm trình tự axit amin chứa axit amin đột biến của Y375M, Y375V, Y375I, Y375T, Y375C, A176C, A176L, P318L+V320L, V320M, hoặc P318A+V320L, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 3 hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Phương án khác đề xuất biến thể polypeptit chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm axit amin tác động đến sự tương tác giữa thuốc diệt cỏ ức chế PPO và polypeptit của PPO, SEQ ID NO: 5 (CyPPO8) (ví dụ, axit amin được định vị trên vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit của SEQ ID NO: 5), được xóa hoặc được thế lần lượt và độc lập bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu, hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Gốc axit amin của polypeptit của SEQ ID NO: 5 được xóa hoặc được thế bằng axit amin khác mà khác với axit amin ban đầu (ví dụ, một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit amin được định vị ở vị trí liên kết với thuốc diệt cỏ ức chế PPO của polypeptit của SEQ ID NO: 5) có thể là một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, và F363 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5.

Theo một phương án cụ thể, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin trong đó một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, và F363 của trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5 được xóa hoặc được thế lần lượt và độc lập bằng axit amin mà được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), F(Phe), P(Pro), W(Trp), N(Asn), Q(Gln), G(Gly), Y(Tyr), D(Asp), E(Glu), R(Arg), H(His), K(Lys), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng ở kiểu đại (ví dụ, được thế bằng axit amin mà được chọn từ nhóm gồm M(Met), V(Val), I(Ile), T(Thr), L(Leu), C(Cys), A(Ala), S(Ser), H(His), G(Gly), v.v. và khác với axit amin ở vị trí tương ứng ở kiểu đại), hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Ví dụ, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm P84L, R85A, R85C, R85H, R85L, R85T, R85V, F363M, F363V, F363L, F363C, F363I, F363T, A162C, A162L, P306L, P306A, V308L, V308M, N362S, V160S, V160C, I343V, I343T, F156A, Q179G, F327V, và L330T, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5, hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Cụ thể hơn, biến thể của polypeptit có thể chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm:

trình tự axit amin chứa một hoặc nhiều đột biến axit amin được chọn từ nhóm gồm đột biến axit amin của P84L, R85A, R85C, R85H, R85L, R85T, R85V, F363M, F363V, F363L, F363C, F363I, F363T, A162C, A162L, P306L, P306A, V308L, V308M, N362S, V160S, V160C, I343V, I343T, F156A, Q179G, F327V, L330T, P84L+F363M, R85A+F363M, R85A+F363I, R85C+F363M, R85H+F363M, R85L+F363M, R85T+F363M, R85V+F363M, R85A+A162L+F363M, R85A+A162L+F363I, R85A+A162C+F363M, R85A+A162C+F363I, R85A+V308M+F363M, V160S+F363M, V160S+F363I, V160S+V308M+F363I, A162L+F363M,

A162C+F363M, A162C+F363I, A162C+F363L, A162C+V308M+F363M, A162C+V308L+F363M, A162L+Q179G+F363M, P306A+V308L, P306L+V308L, V308M+F363M, V308M+F363I, I343T+F363M, I343V+F363M, và N362S+F363M, trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 5, hoặc

trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó.

Biến thể polypeptit chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự (ví dụ, 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn độ đồng nhất trình tự) được mô tả trong bản mô tả có thể duy trì hoạt tính enzym tương đương với hoạt tính enzym của polypeptit có trình tự axit amin mà là tiêu chuẩn xác định độ đồng nhất trình tự (ví dụ, protein PPO có axit amin đột biến được mô tả ở trên), ví dụ, hoạt tính enzym 5% hoặc cao hơn, 10% hoặc cao hơn, 20% hoặc cao hơn, 30% hoặc cao hơn, 40% hoặc cao hơn, 50% hoặc cao hơn, 60% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, hoặc 95% hoặc cao hơn so với polypeptit có trình tự axit amin mà là tiêu chuẩn ở cây trồng (ở toàn bộ cây, ở tế bào hoặc môi trường nuôi cấy tế bào cây trồng, ở mô cây, v.v.), ở tảo, và/hoặc in vitro, và có chức năng để tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ. Phần mô tả độ đồng nhất trình tự được sử dụng để làm rõ là biến thể protein hoặc biến thể polypeptit PPO có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả trong bản mô tả có thể chứa tất cả đột biến trình tự ở phạm vi thỏa mãn điều kiện nêu trên (duy trì hoạt tính enzym và có chức năng để tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ).

Tên của axit amin được sử dụng trong phần mô tả được bố trí như sau:

Axit amin	Mã 3 chữ	Mã 1 chữ
Alanin	Ala	A
Isoleucin	Ile	I
Loxin	Leu	L
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V
Asparagin	Asn	N
Xystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glyxin	Gly	G
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
Axit aspartic	Asp	D
Axit glutamic	Glu	E
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K

Biến thể polypeptit (biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ) có thể duy trì hoạt tính enzym của protein PPO, và có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tăng cường so với kiểu dại.

Ngoài ra, biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể còn chứa đột biến có hoạt tính sinh học bằng với polypeptit gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, hoặc trình tự axit amin có đột biến axit amin được mô tả ở trên. Ví dụ, đột biến bổ sung có thể là sự thay thế axit amin mà không thay thế tổng hoạt tính phân tử, và sự thay thế axit amin này đã biết chung trong lĩnh vực này. Theo một ví dụ, sự thay thế bổ sung có thể là sự thay thế của các gốc axit amin Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, hoặc Asp/Gly, nhưng không bị giới hạn ở đó. Trong một số trường hợp, biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể là dưới cải biến bằng một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm phosphoryl hóa, sulfat hóa, axyl hóa, glycosyl hóa, metyl hóa, farnesyl hóa, v.v. Ngoài ra, biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ có thể chứa biến thể protein trong đó độ ổn định cấu trúc với nhiệt, độ pH, v.v. của protein được tăng lên hoặc hoạt tính protein được tăng lên bằng biến dị (đột biến) và/hoặc cải biến axit amin.

Thuật ngữ “độ đồng nhất trình tự” dùng để chỉ mức độ tương tự với kiểu dại hoặc

trình tự axit amin hoặc trình tự nucleotit tham chiếu, và protein bất kỳ có thể được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, miễn là nó bao gồm các gốc axit amin có độ đồng nhất 60% hoặc cao hơn, 65% hoặc cao hơn, 70% hoặc cao hơn, 75% hoặc cao hơn, 80% hoặc cao hơn, 85% hoặc cao hơn, 90% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ và giữ hoạt tính sinh học tương đương với biến thể protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ. Thể tương đồng protein này có thể chứa vị trí hoạt tính tương đương với của protein đích. Việc so sánh độ đồng nhất có thể được thực hiện bằng mắt hoặc nhờ sự giúp đỡ của chương trình so sánh đã có sẵn. Chương trình máy tính có bán trên thị trường có thể tính phần trăm (%) độ đồng nhất giữa hai hoặc nhiều hơn hai trình tự, và độ đồng nhất (%) có thể được tính trên trình tự tiếp cận. Việc sắp thẳng trình tự để so sánh có thể được thực hiện bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA và TFASTA.

Protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó có thể thu được bằng cách tách chiết từ tự nhiên và tinh sạch bằng phương pháp đã được biết trong lĩnh vực này. Nói cách khác, nó có thể thu được dưới dạng protein tái tổ hợp sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Trong trường hợp sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen, nó có thể thu được bằng quy trình thu thập protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó từ tế bào chủ, sau khi đưa axit nucleic mã hóa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó vào vector biểu hiện thích hợp, và biến nạp tế bào chủ bằng vector để biểu hiện protein đích. Sau khi protein được biểu hiện ở tế bào chủ được chọn, kỹ thuật tách hóa sinh nói chung, ví dụ, xử lý bằng chất làm kết tủa protein (kết tủa kiểu tạo muối), ly tâm, phá vỡ bằng siêu âm, siêu lọc, thẩm tích, sắc ký như sắc ký rây phân tử (lọc gel), sắc ký hấp phụ, sắc ký trao đổi ion, sắc ký ái lực và tương tự có thể được sử dụng để phân lập và tinh sạch nó, và để tách protein có độ tinh khiết cao, các phương pháp này có thể được sử dụng kết hợp.

Phân tử axit nucleic PPO chống chịu thuốc diệt cỏ (polynucleotit mã hóa protein PPO hoặc biến thể của nó) có thể được phân lập hoặc chuẩn bị sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn, ví dụ, phương pháp tổng hợp hóa học hoặc tái tổ hợp, hoặc phương pháp có bán trên thị trường có thể được sử dụng.

Theo phương án cụ thể, protein PPO được tìm thấy là có khả năng chống chịu

thuốc diệt cỏ chính với họ PPO đại diện 9 ức chế thuốc diệt cỏ được phân loại theo cấu trúc hóa học của chúng ở hệ thống thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ sử dụng *E. coli* BT3 thiếu hụt PPO (Δ PPO). Cũng được tìm thấy là protein có thể được biểu hiện ở lá cây thuốc lá bằng cách biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*, và chúng cũng có thể được biểu hiện ở lá cây trồng bằng cách sử dụng peptit vận chuyển (TP). Ngoài ra, được tìm thấy là protein PPO cũng có thể được biểu hiện ở *Columbia-0* kiểu sinh thái *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) bằng vector biểu hiện cây trồng. Dù cây trồng đã biến nạp được xử lý bằng thuốc diệt cỏ ức chế PPO, sự nảy mầm và sinh trưởng của cây trồng quan sát được. Ngoài ra, sự di truyền tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ ở trên cho thế hệ tiếp theo được xác nhận bằng nghiên cứu di truyền.

Do đó, protein PPO và biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả có thể được đưa vào cây trồng hoặc tảo, do đó được sử dụng để tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo.

Một phương án đề xuất chế phẩm để tạo ra và/hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng và/hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều được chọn từ nhóm gồm:

- (1) polypeptit chứa, chủ yếu gồm, hoặc gồm SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, hoặc trình tự axit amin có độ đồng nhất 95% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, hoặc 99% hoặc cao hơn với nó;
- (2) biến thể polypeptit được mô tả ở trên;
- (3) polynucleotit mã hóa polypeptit (1) hoặc biến thể polypeptit (2);
- (4) vector tái tổ hợp chứa polynucleotit; và
- (5) tế bào tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp.

Thuốc diệt cỏ trong bản mô tả dùng để chỉ thành phần hoạt tính mà tiêu diệt, kiểm soát, hoặc nói cách khác biến đổi bất lợi cho sự sinh trưởng của cây trồng hoặc tảo. Ngoài ra, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có nghĩa là ngay cả sau khi xử lý thuốc diệt cỏ mà thường tiêu diệt cây thông thường hoặc kiểu dại hoặc thường ức chế sự sinh trưởng của nó, việc ức chế sự sinh trưởng của cây bị làm yếu hoặc bị triệt tiêu, so với của cây thông thường hoặc kiểu dại, và do đó, cây trồng tiếp tục sinh trưởng. Thuốc diệt cỏ bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế

protoporphyrinogen oxidaza (PPO) của cây trồng hoặc tảo. Thuốc diệt cỏ ức chế PPO này có thể được phân loại thành pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphtalimit, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinedion, và các thuốc diệt cỏ khác theo cấu trúc hóa học của chúng.

Theo phương án cụ thể, thuốc diệt cỏ pyrimidindion bao gồm butafenacil, saflufenacil, benzfendizon, và tiafenacil, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ diphenyl-ete bao gồm fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, acifluorfen, bifenox, etoxyfen, lactofen, chlometoxyfen, chlorintofen, fluoroglycofen-etyl và halosafen, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ phenylpyrazol bao gồm pyraflufen-etyl và fluazolat, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ phenylphtalimit bao gồm flumioxazin, cinidon-etyl và flumiclorac-pentyl, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ phenyleste bao gồm phenopylat (2,4-diclophenyl 1-pyrolidincarboxylat) và chất tương tự cacbamat của phenopylat (ví dụ, O-phenylpyrolidino- và chất tương tự piperidinocacbamat (tham chiếu đến "Ujjana B. Nandihalli, Mary V. Duke, Stephen O. Duke, Relationships between molecular properties and biological activities of O-phenyl pyrrolidino- and piperidinocarbamate herbicides., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(10) 1993-2000")), v.v., nhưng không bị giới hạn ở đó. Theo một phương án, chất tương tự cacbamat của phenopylat có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm axit pyrolidin-1-carboxylic phenyl este (CAS No. 55379-71-0), 1-pyrolidincarboxylicaxit, 2-clophenyl este (CAS No. 143121-06-6), 4-clophenyl pyrolidin-1-carboxylat (CAS No. 1759-02-0), axit carbamic, dietyl-, 2,4-diclo-5-(2-propynyloxy)phenyl este (9CI) (CAS No. 143121-07-7), axit 1-pyrolidincarboxylic, 2,4-diclo-5-hydroxyphenyl este (CAS No. 143121-08-8), 2,4-diclo-5-(metoxycacbonyl)phenyl pyrolidin-1-carboxylat (CAS No. 133636-94-9), 2,4-diclo-5-[(propan-2-yloxy)cacbonyl]phenyl pyrolidin-1-carboxylat (CAS No. 133636-96-1), axit 1-piperidincarboxylic, 2,4-diclo-5-(2-propynyloxy)phenyl este (CAS No. 87374-78-5), 2,4-diclo-5-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl pyrolidin-1-carboxylat (CAS No. 87365-63-7), 2,4-diclo-5-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl 4,4-difluoropiperidin-1-carboxylat (CAS No. 138926-22-4), axit 1-pyrolidincarboxylic, 3,3-difluoro-, 2,4-diclo-

5-(2-propyn-1-yloxy)phenyl este (CAS No. 143121-10-2), 4-clo-2-fluoro-5-[(propan-2-yloxy)cacbonyl]phenyl pyrrolidin-1-carboxylat (CAS No. 133636-98-3), v.v.

Thuốc diệt cỏ thiadiazol bao gồm fluthiacet và thidiazimin, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ oxadiazol bao gồm oxadiargyl và oxadiazon, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ triazolinon bao gồm carfentrazon, sulfentrazon và azafenidin, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ oxazolidinedion bao gồm pentoxazon, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Thuốc diệt cỏ khác bao gồm pyraclonil, flufenpyr-etyl và profluzol, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Gen PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được đề xuất trong bản mô tả có thể được đưa vào cây trồng hoặc tạo bằng các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, và tốt hơn là, bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện để biến nạp cây trồng hoặc tạo.

Trong trường hợp biến nạp cây trồng, gen khởi đầu thích hợp mà có thể có trong vectơ có thể là gen khởi đầu bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này để đưa gen vào cây trồng. Ví dụ, gen khởi đầu có thể bao gồm gen khởi đầu SP6, gen khởi đầu T7, gen khởi đầu T3, gen khởi đầu PM, gen khởi đầu ubiquitin ở cây ngô, gen khởi đầu 35S virus khảm ở cây cải hoa (CaMV), gen khởi đầu nopalín synthaza (nos), gen khởi đầu 35S virus khảm ở cây huyền sâm, gen khởi đầu virus bacilliform ở cây mía, gen khởi đầu virus bệnh đốm vàng ở commelina, gen khởi đầu cảm ứng ánh sáng từ cấu trúc dưới phân tử nhỏ của ribulose-1,5-bisphosphat carboxylaza (ssRUBISCO), gen khởi đầu cytosolic triosephosphat isomeraza (TPI) ở cây lúa, gen khởi đầu adenin phosphoribosyltransferaza (APRT) của *A. thaliana*, gen khởi đầu octopin synthaza, và gen khởi đầu BCB (protein liên kết đồng xanh), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, vectơ có thể bao gồm trình tự tín hiệu poly A gây ra polyadenyl hóa đầu tận cùng 3', và ví dụ, nó có thể bao gồm NOS đầu 3' thu được từ gen nopalín synthaza của *Agrobacterium tumefaciens*, gen kết thúc octopin synthaza thu được từ gen octopin synthaza của *Agrobacterium tumefaciens*, đầu 3' của gen ức chế proteaza I hoặc

II của cây cà chua hoặc cây khoai tây, gen kết thúc 35S CaMV, gen kết thúc α -amylaza RAmy1 A ở cây lúa, và gen kết thúc phaseolin, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, gen khởi đầu cụ thể ở lập lục, gen khởi đầu nhân, gen khởi đầu cấu trúc, hoặc gen khởi đầu cảm ứng có thể được sử dụng để đưa gen vào tảo dưới dạng gen khởi đầu. Gen PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả có thể được thiết kế để liên kết có điều khiển với 5' UTR hoặc 3' UTR, do đó biểu hiện chức năng ở nhân của tảo. Ngoài ra, vectơ có thể còn chứa trình tự điều hòa phiên mã mà thích hợp để biến nạp tảo. Gen tái tổ hợp tạo ra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ có thể được kết hợp vào hệ gen của nhân hoặc hệ gen của lập lục ở tảo chủ, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, ở vectơ, peptit vận chuyển cần để nhắm đích đến lập lục có thể được liên kết với đầu 5' của gen PPO để biểu hiện gen PPO chống chịu thuốc diệt cỏ ở lập lục.

Ngoài ra, một cách tùy ý, vectơ còn có thể bao gồm gen mã hóa trình tự đánh dấu có thể chọn được dưới dạng phân tử báo cáo, và ví dụ của trình tự đánh dấu có thể chọn được có thể bao gồm gen chống chịu các chất kháng sinh (ví dụ, neomycin, carbenicillin, kanamycin, spectinomycin, hygromycin, bleomycin, chloramphenicol, ampicillin v.v.) hoặc thuốc diệt cỏ (glyphosat, glufosinat, phosphinothricin, v.v.), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, vectơ tái tổ hợp để biểu hiện cây trồng có thể bao gồm vectơ hai thành phần *Agrobacterium*, vectơ đồng kết hợp, hoặc vectơ nói chung mà không có vùng T-ADN nhưng được thiết kế để được biểu hiện ở cây trồng. Trong số chúng, vectơ hai thành phần dùng để chỉ vectơ chứa hai hệ thống vectơ tách chứa một plasmid chịu trách nhiệm phân tán gồm trình tự biên bên trái (LB) và trình tự biên bên phải (RB) ở plasmid Ti (cảm ứng u), và plasmid khác để chuyển gen đích, và vectơ có thể bao gồm vùng gen khởi đầu và polyadenyl hóa trình tự tín hiệu để biểu hiện ở cây trồng.

Khi vectơ hai thành phần hoặc vectơ đồng kết hợp được sử dụng, chúng để biến nạp vectơ tái tổ hợp vào cây trồng tốt hơn là *Agrobacterium* (biến nạp qua trung gian *Agrobacterium*). Về mặt này, *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *Agrobacterium rhizogenes* có thể được sử dụng. Ngoài ra, khi vectơ không có vùng T-ADN được sử dụng, điện di, bắn hạt, sự hấp thu qua trung gian polyetylen glycol, v.v. có thể được sử dụng.

dụng để đưa plasmit tái tổ hợp vào cây trồng.

Cây trồng được biến nạp với gen bằng phương pháp ở trên có thể được biệt hóa lại thành cây trồng qua cảm ứng thể sần, rhizogenesis, và sự thích nghi đất sử dụng kỹ thuật tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực này.

Cây trồng được biến nạp trong bản mô tả này được hiểu là bao gồm tế bào ở cây trồng (chứa tế bào được nuôi cấy huyền phù), tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi cũng như cây trồng trưởng thành.

Ngoài ra, phạm vi của thể biến nạp bao gồm thể biến nạp được đưa với gen cũng như dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó (thể hệ T₁, thể hệ T₂, thể hệ T₃, thể hệ T₄, thể hệ T₅, hoặc thể hệ tiếp theo bất kỳ). Ví dụ, cây trồng được biến nạp cũng bao gồm cây trồng có tính trạng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được di truyền dưới dạng thể hệ con hữu tính và vô tính của cây trồng được biến nạp với gen được đề xuất trong bản mô tả. Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm tất cả thể đột biến và biến thể thể hiện đặc điểm của cây trồng được biến nạp ban đầu, cùng với tất cả sản phẩm lai và dung hợp của cây trồng được biến nạp với gen được đề xuất trong bản mô tả. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế cũng bao gồm bộ phận của cây trồng, như hạt giống, hoa, thân, quả, lá, rễ, củ, và/hoặc rễ củ, được bắt nguồn từ cây trồng được biến nạp mà được biến nạp trước bằng phương pháp theo sáng chế, hoặc thể hệ con của nó, và bao gồm ít nhất một phần của tế bào được biến nạp.

Cây trồng, áp dụng sáng chế, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó, mà có thể là ít nhất một được chọn từ nhóm gồm cây trồng một lá mầm hoặc hai lá mầm. Ngoài ra, cây trồng bao gồm cây thân cỏ hoặc cây lấy gỗ. Cây một lá mầm có thể bao gồm cây trồng thuộc họ Alismataceae, Hydrocharitaceae, Juncaginaceae, Scheuchzeriaceae, Potamogetonaceae, Najadaceae, Zosteraceae, Liliaceae, Haemodoraceae, Agavaceae, Amaryllidaceae, Dioscoreaceae, Pontederiaceae, Iridaceae, Burmanniaceae, Juncaceae, Commelinaceae, Eriocaulaceae, Gramineae (Poaceae), Araceae, Lemnaceae, Sparganiaceae, Typhaceae, Cyperaceae, Musaceae, Zingiberaceae, Cannaceae, Orchidaceae, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Cây hai lá mầm có thể bao gồm cây trồng thuộc họ Diapensiaceae, Clethraceae, Pyrolaceae, Ericaceae, Myrsinaceae, Primulaceae, Plumbaginaceae, Ebenaceae, Styracaceae, Symplocaceae, Symplocaceae, Oleaceae, Loganiaceae, Gentianaceae,

Menyanthaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Rubiaceae, Polemoniaceae, Convolvulaceae, Boraginaceae, Verbenaceae, Labiatae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Bignoniaceae, Acanthaceae, Pedaliaceae, Orobanchaceae, Gesneriaceae, Lentibulariaceae, Phrymaceae, Plantaginaceae, Caprifoliaceae, Adoxaceae, Valerianaceae, Dipsacaceae, Campanulaceae, Compositae, Myricaceae, Juglandaceae, Salicaceae, Betulaceae, Fagaceae, Ulmaceae, Moraceae, Urticaceae, Santalaceae, Loranthaceae, Polygonaceae, Phytolaccaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae, Portulacaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Cactaceae, Magnoliaceae, Illiciaceae, Lauraceae, Cercidiphyllaceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Lardizabalaceae, Menispermaceae, Nymphaeaceae, Ceratophyllaceae, Cabombaceae, Saururaceae, Piperaceae, Chloranthaceae, Aristolochiaceae, Actinidiaceae, Theaceae, Guttiferae, Droseraceae, Papaveraceae, Capparidaceae, Cruciferae, Platanaceae, Hamamelidaceae, Crassulaceae, Saxifragaceae, Eucommiaceae, Pittosporaceae, Rosaceae, Leguminosae, Oxalidaceae, Geraniaceae, Tropaeolaceae, Zygophyllaceae, Linaceae, Euphorbiaceae, Callitrichaceae, Rutaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Polygalaceae, Anacardiaceae, Aceraceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Sabiaceae, Balsaminaceae, Aquifoliaceae, Celastraceae, Staphyleaceae, Buxaceae, Empetraceae, Rhamnaceae, Vitaceae, Elaeocarpaceae, Tiliaceae, Malvaceae, Sterculiaceae, Thymelaeaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Violaceae, Passifloraceae, Tamaricaceae, Elatinaceae, Begoniaceae, Cucurbitaceae, Lythraceae, Punicaceae, Onagraceae, Haloragaceae, Alangiaceae, Cornaceae, Araliaceae, và Umbelliferae(Apiaceae), nhưng không bị giới hạn ở đó.

Theo phương án cụ thể, cây trồng có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm cây lương thực như cây lúa, cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây ngô, cây đậu tương, cây khoai tây, cây đậu đỏ, cây yến mạch, và cây lúa miến; cây rau như bắp cải Trung Quốc, củ cải, ớt đỏ, dâu tây, cà chua, dưa hấu, dưa chuột, bắp cải, dưa lê, bí ngô, hành hoa, củ hành, và cà rốt; các cây cho mục đích sử dụng cụ thể như nhân sâm, cây thuốc lá, cây bông, cỏ tươi, cỏ làm thức ăn cho gia súc, cây vừng, cây mía, củ cải đường, *Perilla* sp., cây lạc, hạt cải, cỏ, và dầu thầu dầu cây trồng; cây ăn quả như cây táo, cây lê, cây táo ta, cây đào, cây kiwi, cây nho, cây họ cam quýt, cây hồng vàng, cây mận, cây mơ và cây chuối; cây lấy gỗ như gỗ thông, dầu cọ, và cây khuynh diệp; cây hoa như cây hoa hồng, hoa lay-on, cây đồng tiền, hoa cẩm chướng, cây hoa cúc, cây hoa ly và cây

hoa tuy-lip; và cỏ khô làm thức ăn cho gia súc như rơm rạ, cỏ ba lá đỏ, cỏ nón cho mèo, cây linh lăng, cỏ roi và cỏ lòng lưu niên, nhưng không bị giới hạn ở. Theo phương án cụ thể, cây trồng có thể là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm hai lá mầm cây trồng như arabidopsis, cây khoai tây, cây cà tím, cây thuốc lá, ớt đỏ, cà chua, cây ngưu bàng, cây tần ô, cây rau diếp, cây cát cánh, cây rau chân vịt, cây cải cầu vồng, cây khoai lang, cây cần tây, cà rốt, cần nước, mùi tây, bắp cải Trung Quốc, bắp cải, củ cải, dưa hấu, dưa lê, dưa chuột, bí ngô, cây bầu, dâu tây, cây đậu tương, cây đậu xanh, cây đậu tây, và cây đỗ; và cây một lá mầm như cây lúa, cây lúa mỳ, cây lúa mạch, cây ngô, cây lúa miến, v.v., nhưng không giới hạn ở đó.

Tảo, áp dụng sáng chế, nhưng không giới hạn cụ thể ở đó, mà bao gồm tảo không nhân hoặc tảo có nhân. Ví dụ, tảo có thể là cyanobacteria, tảo xanh, tảo đỏ, tảo nâu, rong biển, hoặc vi tảo.

Cyanobacteria bao gồm Chroococcales phylum (ví dụ, Aphanocapsa, Aphanothece, Chamaesiphon, Chondrocystis, Chroococcus, Chroogloeocystis, Crocosphaera, Cyanobacterium, Cyanobium, Cyanodictyon, Cyanosarcina, Cyanothece, Dactylococcopsis, Gloeocapsa, Gloeotheca, Halothece, Johannesbaptistia, Merismopedia, Microcystis, Radiocystis, Rhabdoderma, Snowella, Synechococcus, Synechocystis, Thermosynechococcus, Woronichinia), Gloeobacteria phylum, Nostocales phylum (ví dụ, Microchaetaceae, Nostocaceae, Rivulariaceae, Scytonemataceae), Oscillatoriales phylum (ví dụ, Arthronema, Arthrospira, Blennothrix, Crinalium, Geitlerinema, Halomicronema, Halospirulina, Hydrocoleum, Jaaginema, Katagnymene, Komvophoron, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Microcoleus, Oscillatoria, Phormidium, Planktothricoides, Planktothrix, Plectonema, Pseudanabaena, Pseudophormidium, Schizothrix, Spirulina, Starria, Symploca, Trichodesmium, Tychonema), Pleurocapsales phylum (ví dụ, Chroococcidiopsis, Dermocarpa, Dermocarpella, Myxosarcina, Pleurocapsa, Solentia, Stanieria, Xenococcus), Prochlorales phylum, hoặc Stigonematales phylum (for example, Capsosira, Chlorogloeopsis, Fischerella, Hapalosiphon, Mastigocladopsis, Mastigocladus, Nostochopsis, Stigonema, Symphyonema, Symphonemopsis, Umezakia, Westiellopsis), v.v.

Chlorophyta, Chlamydomonas, Volvaceales, Dunaliella, Scenedesmus, Chlorella,

hoặc Hematococcm có thể được lấy làm ví dụ khác của tảo.

Phaeodactylum tricornutum, *Amphiprora hyaline*, *Amphora* spp., *Chaetoceros muelleri*, *Navicula saprophila*, *Nitzschia communis*, *Scenedesmus dimorphus*, *Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis suecica*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Neochloris oleoabundans*, *Synechococcus elongatus*, *Botryococcus braunii*, *Gloeobacter violaceus*, *Synechocystis*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Nannochloropsis oculata*, *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Botryococcus sudeticus*, *Euglena gracilis*, *Neochloris oleoabundans*, *Nitzschia palea*, *Pleurochrysis carterae*, *Tetraselmis chuii*, *Pavlova* spp., *Aphanocapsa* spp., *Synechosystis* spp., *Nannochloris* spp., v.v. có thể được lấy làm ví dụ khác của tảo. Tuy nhiên, không giới hạn ở các loại được nêu ở trên, và tảo thuộc các giống và họ khác nhau khác có thể được chứa.

Cây trồng hoặc tảo được đưa với PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc biến thể của nó được đề xuất trong bản mô tả có thể có khả năng chống chịu với hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ ức chế PPO.

Do đó, công nghệ được đề xuất trong bản mô tả có thể được sử dụng để kiểm soát cỏ dại hoặc loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn bằng cách sử dụng hai hoặc nhiều hơn hai loại thuốc diệt cỏ ức chế PPO lần lượt hoặc đồng thời.

Một phương án đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt, bao gồm bước cung cấp cho đất trồng trọt cây trồng chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó được mô tả ở trên, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt.

Phương án khác đề xuất phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn khỏi môi trường nuôi trồng, bao gồm bước cung cấp cho môi trường nuôi trồng tảo chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó được mô tả ở trên, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

Ngoài ra, protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó được đề xuất trong bản mô tả có thể được sử dụng kết hợp polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó.

Do đó, cây trồng hoặc tảo được đưa với PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được đề xuất trong bản mô tả có thể có khả năng chống chịu với hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ mà khác nhau về cơ chế tác dụng. Theo sáng chế, hai hoặc nhiều hơn hai thuốc diệt cỏ khác nhau bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế PPO, khác nhau về cơ chế tác dụng, có thể được sử dụng lần lượt hoặc đồng thời, do đó kiểm soát được cỏ dại và/hoặc loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn. Sau đây, thuốc diệt cỏ khác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO về cơ chế ảnh hưởng được gọi là “thuốc diệt cỏ thứ hai”.

Một phương án đề xuất chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó; và thuốc diệt cỏ thứ hai chống chịu polypeptit hoặc gen mã hóa của nó.

Phương án khác đề xuất thể biến nạp có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, hoặc dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó, chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó; và thuốc diệt cỏ thứ hai chống chịu polypeptit hoặc gen mã hóa của nó.

Phương án khác đề xuất phương pháp tạo ra cây trồng hoặc tảo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, bao gồm bước biến nạp tảo, hoặc cây trồng tế bào, tế bào trần, thể sản, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây bằng protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó; và thuốc diệt cỏ thứ hai chống chịu polypeptit hoặc gen mã hóa của nó.

Phương án khác đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt, bao gồm bước cung cấp cho đất trồng trọt cây trồng chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ được mô tả ở trên, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó; và thuốc diệt cỏ thứ hai chống chịu polypeptit hoặc gen mã hóa của nó, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt.

Phương án khác đề xuất phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn khỏi môi trường nuôi trồng, bao gồm bước cung cấp cho môi trường nuôi trồng tảo chứa protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ, biến thể của nó, hoặc gen mã hóa của nó; và polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó, và bước sử dụng liều lượng có hiệu quả thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi trồng.

Ví dụ, cây trồng hoặc tạo còn bao gồm polypeptit có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó, do đó có khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ thứ hai mới và/hoặc được tăng cường.

Ví dụ, thuốc diệt cỏ thứ hai có thể bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế phân bào, thuốc diệt cỏ ức chế quang hợp, thuốc diệt cỏ ức chế sự tổng hợp axit amin, thuốc diệt cỏ ức chế plastit, thuốc diệt cỏ ức chế màng tế bào, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó. Thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy ví dụ bởi glyphosat, glufosinat, dicamba, 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic), thuốc diệt cỏ ức chế ALS (axetolactat synthaza) (ví dụ, imidazolidinon, sulfonylure, triazol pyrimidin, sulphonanilit, pyrimidin thiobenzoat, v.v.), thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II, thuốc diệt cỏ gốc phenylure, thuốc diệt cỏ ức chế plastit, thuốc diệt cỏ gốc bromoxynil, và/hoặc tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ví dụ, polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy làm ví dụ là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm EPSPS chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza chống chịu glyphosat), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza) hoặc glyphosat decarboxylaza; PAT chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat (phosphinothricin-N-axetyltransferaza); DMO chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba (dicamba monooxyaza); 2,4-D monooxyaza hoặc AAD chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D (aryloxyalkanoat dioxyaza); ALS chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS (axetolactat synthaza), AHAS (axetohydroxyaxit synthaza), hoặc AtAHASL (cấu trúc dưới phân tử lớn axetohydroxyaxit synthaza); hệ thống quang hóa II protein D1 chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II; cytochrom P450 chống chịu thuốc diệt cỏ gốc phenylure; HPPD chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế plastit (hydroxylphenylpyruvat dioxyaza); nitrilaza chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, gen mã hóa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai có thể được lấy làm ví dụ là một hoặc nhiều loại được chọn từ nhóm gồm gen cp4 epsps, epsps (AG), mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 hoặc gat4621 chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat; gen bar, pat hoặc pat (SYN) chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat; gen dmo chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba; gen AAD-1 hoặc AAD-12 chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D; ALS, GM-HRA, S4-HRA, ZM-HRA, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, SurA hoặc SurB chống chịu thuốc

diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS; gen psba chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II; gen CYP76B1 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure; gen HPPDPF W336 chống chịu thuốc diệt cỏ isoxaflutol; gen bxn chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và tổ hợp bất kỳ của nó, nhưng không bị giới hạn ở đó.

Tác dụng có lợi

Biến thể của protein PPO chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc gen mã hóa của nó được đề xuất trong bản mô tả được áp dụng cho cây trồng hoặc tảo, do đó tạo ra và/hoặc tăng cường tính trạng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ tốt hơn, và việc kiểm soát chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng thuốc diệt cỏ, do đó kiểm soát cỏ dại hoặc loại bỏ sinh vật thủy sinh một cách kinh tế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào trong trường hợp xử lý tiafenacil ở nồng độ 0 μ M (micromol), 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 400 μ M, sau khi biến nạp BT3 *E. coli* thiếu hụt PPO (BT3(Δ PPO)) bằng vector rỗng pACBB (được thể hiện bằng V), gen *A. thaliana* PPO1 (được thể hiện bằng WT), gen kiểu dại CyPPO2 (được thể hiện bằng Cy2), gen kiểu dại CyPPO4 (được thể hiện bằng Cy4), hoặc gen kiểu dại CyPPO8 (được thể hiện bằng Cy8).

FIG. 2 là bản đồ vector pET29b.

FIG. 3 là bản đồ vector pACBB-eGFP.

FIG. 4 là bản đồ vector pET303-CT-His.

FIG. 5 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3 *E. coli* thiếu hụt PPO (BT3(Δ PPO)) được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO2 (được thể hiện bằng Cy2 WT), hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng tiafenacil ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 6 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT, hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng saflufenacil ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 7 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng

flumioxazin ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 8 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng fomesafen ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 9 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng acifluorfen ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 10 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraclostrobin ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 11 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng sulfentrazone ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 12 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng pentoxazon ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 13 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy2 WT hoặc các gen đột biến CyPPO2 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraflufen-ethyl ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 14 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO4 (được thể hiện bằng Cy4 WT) hoặc các gen đột biến CyPPO4 khác nhau, khi được xử lý bằng tiafenacil ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 15 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy4 WT hoặc các gen đột biến CyPPO4 khác nhau, khi được xử lý bằng saflufenacil ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 16 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy4 WT hoặc các gen đột biến CyPPO4 khác nhau, khi được xử lý bằng flumioxazin ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 17 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với gen kiểu dại CyPPO8 (được thể hiện bằng Cy8 WT) hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng tiafenacil ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M và 400 μ M, trong đó đỉnh là kết quả thu được bằng cách sử dụng vector pET303-CT-His, và đáy là kết quả thu được bằng cách sử dụng vector pACBB.

FIG. 18 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng saflufenacil ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 19 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng fomesafen ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 20 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng acifluorfen ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 21 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng flumioxazin ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 22 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng sulfentrazone ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 23 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng pentoxazon ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 24 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraflufen-ethyl ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 25 là ảnh thể hiện mức sinh trưởng tế bào của thể biến nạp BT3(Δ PPO) được biến nạp với Cy8 WT hoặc các gen đột biến CyPPO8 khác nhau, khi được xử lý bằng pyraclostrobin ở nồng độ lần lượt là 0 μ M, 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M và 200 μ M.

FIG. 26 là biểu đồ thể hiện vector tái tổ hợp để chuẩn bị protein dung hợp trong đó MBP (protein liên kết maltoza) và protein PPO được dung hợp.

FIG. 27 là bản đồ vector pMAL-c2X.

FIG. 28 thể hiện kết quả của SDS-PAGE để phân lập và tinh chế protein kiểu đại CyPPO2 và protein biến thể CyPPO2-Y373M.

FIG. 29 thể hiện kết quả của SDS-PAGE để phân lập và tinh chế protein kiểu đại CyPPO4 và protein biến thể CyPPO4-Y375M.

FIG. 30 thể hiện kết quả của SDS-PAGE để phân lập và tinh chế protein kiểu đại CyPPO8 và protein biến thể CyPPO8-F363M.

FIG. 31 là biểu đồ thể hiện mẫu cấu trúc của vector hai thành phần để biến nạp cây trồng của gen CyPPO.

FIG. 32 thể hiện mức nảy mầm hạt giống của thể biến nạp *A. thaliana* (T₂) trong đó gen đột biến của CyPPO2, CyPPO4 hoặc CyPPO8 được đưa, khi làm nảy mầm hạt giống trong môi trường chứa các nồng độ khác nhau của tiafenacil. Col-O có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 33 thể hiện kết quả thấm tách western thể hiện mức biểu hiện của protein biến thể CyPPO ở *A. thaliana* (T₂) được chuyển nhiễm bằng gen đột biến của CyPPO2, CyPPO4 hoặc CyPPO8. Col-0 có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 34 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 sau khi phun 5µM tiafenacil vào *A. thaliana* (T₃) được biến nạp trong đó gen mã hóa biến thể CyPPO2 Y373M hoặc biến thể CyPPO8 F363M được đưa. Col-O có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 35 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 sau khi phun 5µM saflufenacil vào *A. thaliana* (T₃) được biến nạp trong đó gen mã hóa biến thể CyPPO2 Y373M, biến thể CyPPO4 Y375M hoặc biến thể CyPPO8 F363M được đưa. Col-O có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 36 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 sau khi phun 5µM Fomesafen vào *A. thaliana* (T₃) được biến nạp trong đó gen mã hóa biến thể CyPPO2 Y373M hoặc biến thể CyPPO8 F363M được đưa. Col-O có nghĩa là *A. thaliana* không chuyển gen.

FIG. 37 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 sau khi phun 25 µM hoặc 5 µM

tiafenacil hoặc 75 μ M saflufenacil vào *A. thaliana* (T₃ hoặc T₂) được biến nạp trong đó gen mã hóa Y373I, Y373L, Y373V, Y373C, Y373M, V318M+Y373I, V173S+A175C+Y373M, hoặc biến thể A175C+V318M+Y373M của CyPPO2 được đưa lần lượt.

FIG. 38 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 sau khi phun 25 μ M hoặc 10 μ M tiafenacil hoặc nồng độ 100 μ M saflufenacil vào *A. thaliana* (T₃ hoặc T₂) được biến nạp trong đó gen mã hóa F363V, F363L, A162L, hoặc biến thể A162C+V308M+F363M của CyPPO8 được đưa.

FIG. 39 là bản đồ vectơ pCAMBIA3301.

FIG. 40 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 sau khi phun thuốc diệt cỏ ức chế PPO vào cây lúa Dongjin kiểu đại và thể hệ T₀ của thể biến nạp của cây lúa Dongjin được biến nạp với gen đột biến CyPPO2 Y373M hoặc gen đột biến CyPPO8 F363M, trong đó A là ảnh sau khi xử lý 853g ai/ha tiafenacil, và B là ảnh sau khi xử lý 2,087g ai/ha saflufenacil.

FIG. 41 thể hiện kết quả quan sát được ở ngày 7 ảnh sau khi phun thuốc diệt cỏ ức chế PPO vào thể biến nạp CyPPO2 Y373M T₂ dòng số 3 và thể biến nạp CyPPO8 F363M T₂ dòng số 3 của cây lúa Dongjin, trong đó A là ảnh sau khi xử lý 420g ai/ha tiafenacil, và B là ảnh sau khi xử lý 840g ai/ha saflufenacil (1: lá non $\rightarrow$ 4: lá già). Dongjin có nghĩa là cây (giống) lúa không chuyển gen.

FIG. 42 là kết quả thấm tách western thể hiện biểu hiện của protein biến thể CyPPO2 Y373M ở lá của thể biến nạp CyPPO2 Y373M của cây lúa Dongjin.

FIG. 43 là kết quả thấm tách western thể hiện biểu hiện của protein biến thể CyPPO8 F363M ở lá của thể biến nạp CyPPO8 F363M của cây lúa Dongjin.

FIG. 44 là kết quả thấm tách southern kiểm tra xem liệu CyPPO8 F363M có mặt ở thể biến nạp CyPPO8 F363M của cây lúa Dongjin hay không.

FIG. 45 là ảnh thể hiện mức khả năng chống chịu với các thuốc diệt cỏ khác nhau của thể biến nạp *A. thaliana* (T₃) trong đó gen đột biến Y373I của CyPPO2 và F363V của CyPPO8 lần lượt được đưa.

FIG. 46 là ảnh thể hiện mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thể hệ T₄ của thể biến nạp *A. thaliana* trong đó gen đột biến Y373I của CyPPO2 và F363V của

CyPPO8 lần lượt được đưa.

FIG. 47 là ảnh thể hiện mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thế hệ T₅ của thể biến nạp được đưa vào CyPPO2 Y373I và thể biến nạp được đưa vào CyPPO8 F363V của *A. thaliana*.

FIG. 48 là kết quả thấm tách western thể hiện biểu hiện protein PPO của thế hệ T₄ của thể biến nạp được đưa vào CyPPO2 Y373I và thể biến nạp được đưa vào CyPPO8 F363V của *A. thaliana*.

FIG. 49 là kết quả thấm tách western thể hiện biểu hiện protein PPO của thế hệ T₅ của thể biến nạp được đưa vào CyPPO2 Y373I và thể biến nạp được đưa vào CyPPO8 F363V của *A. thaliana*.

FIG. 50 là sơ đồ cấu trúc thể hiện mẫu cấu trúc của vectơ để biến nạp cây đậu tương.

FIG. 51 là kết quả thấm tách southern kiểm tra xem liệu gen đột biến có mặt ở thể biến nạp CyPP02 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M của cây đậu tương hay không.

FIG. 52 là ảnh thể hiện mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thế hệ T₂ của thể biến nạp CyPP02 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M của cây đậu tương. Kwangan có nghĩa là cây (giống) đậu tương không chuyển gen

FIG. 53 là kết quả thấm tách western kiểm tra xem liệu protein CyPPO2 Y373M và protein CyPPO8 F363M được biểu hiện ở lá của thể biến nạp CyPPO2 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M của cây đậu tương, lần lượt.

FIG. 54 là ảnh thể hiện ảnh sinh trưởng trước (phía trên) và sau (phía dưới) khi xử lý tiafenacil cho thể biến nạp CyPPO8 F363M của hạt cải. Youngsan có nghĩa là hạt cải (giống) không chuyển gen.

FIG. 55 là ảnh thể hiện ảnh sinh trưởng trước (phía trên) và sau (phía dưới) khi xử lý saflufenacil cho thể biến nạp CyPPO8 F363M của hạt cải. Kiểu đại có nghĩa là hạt cải (giống) không chuyển gen.

FIG. 56 thể hiện kết quả thấm tách western kiểm tra xem liệu protein CyPPO8 F363M được biểu hiện ở lá của thể biến nạp CyPPO8 F363M của hạt cải (phía trên) và

thể hiện kết quả nhuộm Coomassie (phía dưới).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng cách tham khảo các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không dự định bị giới hạn bởi các ví dụ.

Ví dụ 1. Phân lập gen PPO từ sinh vật chưa có nhân điển hình

Oscillatoria nigro-viridis PCC 7112, chủng *Lyngbya* sp. PCC 8106, và chủng *Halothece* sp. PCC 7418 được đề xuất bởi Institut Pasteur (France), và gen PPO được phân lập từ mỗi chủng. Mỗi gen PPO được tổng hợp sử dụng thông tin trình tự được tối ưu hóa codon để sàng lọc tính chống chịu thuốc diệt cỏ hiệu quả ở BT3 *E. coli*. Gen PPO đã tổng hợp được mở rộng sử dụng đoạn môi của bảng 1.

Một microlit (1 µl) của mỗi mẫu (ADN hệ gen của mỗi chủng), 5 µl chất đệm 10X, 1 µl hỗn hợp dNTP (mỗi 10 mM), 1 µl đoạn môi xuôi (tham chiếu đến bảng 1; 10 µM), 1 µl đoạn môi ngược (tham chiếu đến bảng 1; 10 µM), 40 µl DDW, và 1 µl Pfu-X (Solgent, 2,5 unit/µl) được trộn để điều chế 50 µl hỗn hợp phản ứng PCR, và việc mở rộng được thực hiện trong điều kiện ở 94°C trong 4 phút, và 25 chu kỳ (ở 94°C trong 30 giây, ở 56°C trong 30 giây và ở 72°C trong 1,5 phút), ở 72°C trong 5 phút.

PPO được phân lập từ *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112 được chỉ định là CyPPO2, PPO được phân lập từ *Lyngbya* sp. Chủng PCC 8106 được chỉ định là CyPPO4, và PPO được phân lập từ chủng *Halothece* sp. PCC 7418 được chỉ định là CyPPO8.

Ngoài ra, trình tự nucleotit tương ứng của CyPPO2, CyPPO4, và CyPPO8 và trình tự axit amin được mã hóa bởi trình tự tương ứng được kiểm tra, và được thể hiện bởi SEQ ID NOS: 1 đến 6.

Bảng 1

Chủng	Đoạn môi	Trình tự	SEQ ID NO:
<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> PCC 7112	CyPPO2_F	CCCCGGATCCATGGAACCTTCTTGATACTCT	12
	CyPPO2_R	CCCCCTCGAGGATTGACC TGGTATCACTCT	13

<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	CyPPO4_F	CCCCGGATCCATGACCCATGTTTTGGATTC	14
	CyPPO4_R	CCCCCTCGAGCTGTCCTAAAAATGATAAA ATCTCG	15
<i>Halotheca</i> sp. PCC 7418	CyPPO8_F	CCCCGGATCCATGATAGATACTCTTATAGT	16
	CyPPO8_R	GGG CCCCCTCGAGTCCTAAGTAATCTAAACTG	17

Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của CyPPO2, CyPPO4, và CyPPO8 chuẩn bị ở trên được thử nghiệm sử dụng *E. coli* thiếu hụt PPO (BT3 (Δ PPO)). Chủng BT3 (Δ PPO) được đề xuất bởi Hokkaido University (Japan) và nó là chủng *E. coli* mà thiếu hụt PPO kiểu hemG và có khả năng chống chịu Kanamycin (tham chiếu đến "Watanabe et al., Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame inhibition codons, JBC 2001 276(23):20474–20481; Che et al., Molecular Characterization and Subcellular Localization of Protoporphyrinogen Oxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Physiol. 2000 Sep;124(1):59-70").

BT3 (Δ PPO) được biến nạp với mỗi gen CyPPO, và được nuôi cấy trên môi trường thạch agar LB (Luria-Bertani) chứa thuốc diệt cỏ ức chế PPO, do đó kiểm tra xem liệu sự sinh trưởng của *E. coli* được biến nạp được ức chế hay không.

Quy trình thử nghiệm cụ thể như sau:

Gen CyPPO2, CyPPO4, và CyPPO8 chuẩn bị ở trên được tách dòng ở vector pACBB (Plasmid #32551; Addgen; tham chiếu đến FIG. 3). Plasmid đã tách dòng được bổ sung vào tế bào khả biến BT3 một cách tương ứng, do đó biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt. *E. coli* được biến nạp với mỗi gen CyPPO được nuôi cấy trong môi trường thạch agar LB chứa cloramphenicol (34 μ g/ml, Duchefa).

Cụm nấm đơn của *E. coli* được biến nạp với mỗi gen CyPPO được nuôi cấy trong 3 ml canh LB chứa cloramphenicol qua đêm (220 rpm, 37°C), và sau đó mỗi giống cấy được nuôi cấy lại với môi trường mới cho tới khi hệ số hấp thụ (OD_{600}) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1. Nó được pha loãng bằng canh LB để hệ số hấp thụ (OD_{600}) là 0,5. Tương tự, dung dịch đã pha loãng được pha loãng liên tục 5 lần theo hệ số 0,1. Tiếp theo, 10 μ l mỗi dung dịch đã pha loãng được nhỏ giọt lên môi trường thạch agar LB chứa cloramphenicol (34 μ g/ml) và nồng độ 0–400 μ M tiafenacil. Môi trường thạch

agar LB được nuôi cấy ở 37°C dưới điều kiện ánh sáng, và mức ức chế sinh trưởng được đánh giá sau 16 đến 20 giờ.

Để so sánh, thử nghiệm tương tự được tiến hành sử dụng thể biến nạp BT3 *E. coli* được biến nạp với vectơ pACBB-eGFP (Plasmid #32551; Addgene; tham chiếu đến FIG. 3) và thể biến nạp BT3 *E. coli* được đưa với gen PPO kiểu dại thu được từ *A. thaliana* (AtPPO1 kiểu dại) (SEQ ID NO: 8).

Như được thể hiện trên FIG. 1, thể biến nạp BT3 *E. coli* của gen CyPPO2, CyPPO4, và CyPPO8 có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ cao hơn so với thể biến nạp *E. coli* của gen AtPPO1 ở tất cả các nồng độ thuốc diệt cỏ được thử nghiệm.

Ví dụ 2. Xác định các gốc axit amin PPO tương tác với thuốc diệt cỏ ức chế PPO từ PPO và phức hợp thuốc diệt cỏ ức chế PPO

Để xác nhận thông tin cấu trúc liên kết của protein PPO và thuốc diệt cỏ, tiafenacil được sử dụng làm ví dụ đại diện của thuốc diệt cỏ ức chế PPO.

Để thu được protein CyPPO2 tan trong nước, 7 gốc axit amin kỵ nước mà được định vị ở miền liên kết màng thylakoit ở axit amin của CyPPO2 (SEQ ID NO: 1) được thế bằng gốc ưa nước. Gen mã hóa protein biến thể được thế các gốc axit amin của CyPPO2 được tách dòng đến vectơ pET29b (Catalog Số: 69872-3; EMD Biosciences; tham chiếu đến FIG. 2), và protein CyPPO2 được biểu hiện sử dụng hệ thống *E. coli*. Protein CyPPO2 đã biểu hiện được tinh chế qua sắc ký ái lực niken và được kết tinh. Phức hợp CyPPO2 và tiafenacil thu được bằng cách cho thấm 3 mM tiafenacil, và được sử dụng để nhiễu xạ tia X bằng thiết bị tăng tốc bức xạ synchrotron. Dữ liệu nhiễu xạ tia X của quá trình hòa tan 2,8Å của tinh thể phức hợp CyPPO2-tiafenacil thu được, và cấu trúc ba chiều được xác định, và vị trí liên kết của tiafenacil ở protein CyPPO2 được phân tích. Là kết quả của phân tích cấu trúc của phức hợp CyPPO2 và tiafenacil, axit amin của vị trí S63, P91, R92, F169, V173, A175, E228, L229, P316, V318, F337, L340, G351, T352, I353 và Y373 của protein CyPPO2 (SEQ ID NO: 1) tương tác với tiafenacil.

Và cũng vậy, việc sử dụng thông tin thu được từ cấu trúc của phức hợp CyPPO2-tiafenacil, các gốc axit amin mà tương tác với tiafenacil ở protein CyPPO4 (SEQ ID NO: 3) và CyPPO8 (SEQ ID NO: 5) (NCBI BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch

h&LINK_LOC=blasthome) được xác định bằng cách phân tích độ đồng nhất trình tự như ở dưới.

Các axit amin của protein CyPPO4 (SEQ ID NO: 3) tương tác với tiafenacil là N63, S64, S66, P67, P92, R93, F170, S172, G173, V174, Y175, A176, R190, E230, L231, P318, V320, F339, G340, N341, L342, L352, G353, T354, I355, Y375, I424, V458, và R465. Các axit amin của protein CyPPO8 (SEQ ID NO: 5) tương tác với tiafenacil là P84, R85, F156, V160, A162, Q179, P306, V308, F327, L330, I343, N362, và F363.

Ví dụ 3. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO bằng biến thể PPO (thử nghiệm ở *E. coli*)

Để tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8, (các) đột biến ở vị trí tương tác với thuốc diệt cỏ thu được ở ví dụ 2 được đưa, một cách lần lượt. BT3 (Δ PPO) được biến nạp với gen CyPPO đột biến, và được nuôi cấy dưới điều kiện được xử lý bằng thuốc diệt cỏ ức chế PPO, do đó kiểm tra xem liệu việc sinh trưởng của BT3 được biến nạp được ức chế hay không. Kiểu đại của mỗi gen được sử dụng làm đối chứng.

Phương pháp thử nghiệm như sau:

CyPPO2 và CyPPO4 được tách dòng ở vector pACBB (Plasmit #32551; Addgen; tham chiếu đến FIG. 3) được tạo đột biến sử dụng đoạn môi của bảng 2 và 3, và CyPPO8 được tách dòng ở vector pACBB hoặc vector pET303-CT-His (VT0163; Novagen; tham chiếu đến FIG. 4) được tạo đột biến sử dụng đoạn môi của bảng 4.

Năm mươi microlit hỗn hợp phản ứng PCR được chuẩn bị bằng cách trộn 1 μ l mẫu, 5 μ l chất đệm 10X, 1 μ l hỗn hợp dNTP (mỗi 10 mM), 1 μ l đoạn môi xuôi (10 μ M), 1 μ l đoạn môi ngược (10 μ M), 40 μ l DDW, và 1 μ l Pfu-X (Solgent, 2,5 unit/ μ l), và việc mở rộng được thực hiện dưới điều kiện ở 94°C trong 4 phút, và 17~25 chu kỳ (ở 94°C trong 30 giây, ở 56~65°C trong 30 giây và ở 72°C trong 3 phút), ở 72°C trong 5 phút. 0,5 μ l DpnI (New England Biolabs) được xử lý với mỗi 5 μ l sản phẩm PCR, và được ủ ở 37°C trong 30 phút. Dung dịch phản ứng được biến nạp với *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt. Mỗi thể biến nạp được nuôi cấy trong môi trường thạch agar LB chứa

cloramphenicol hoặc ampicillin. Mỗi đột biến được xác nhận bằng cách xác định trình tự ADN plasmit, và mỗi plasmit được biến nạp vào BT3 (Δ PPO).

Bảng 2

Đoạn mồi để đột biến CyPPO2

Số	Đột biến CyPPO2	Đoạn mồi (Xuôi: trên; Ngược: dưới) (5'→ 3')
1	Y373M	GACCTCTATGATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 18)
		ACCAATCATAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 19)
2	Y373V	GACCTCTGTGATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 20)
		ACCAATCACAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 21)
3	Y373I	GACCTCTATCATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 22)
		ACCAATGATAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 23)
4	Y373T	GACCTCTACAATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 24)
		ACCAATTGTAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 25)
5	Y373L	GACCTCTTTGATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 26)
		ACCAATCAAAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 27)
6	Y373C	GACCTCTTGTATTGGTGGAGCTACTGATAG (SEQ ID NO: 28)
		ACCAATACAAGAGGTCAATGTTTGCCATCC (SEQ ID NO: 29)
7	A175C	GGTGTGTACTGTGGAGATCCTCAACAGCTC (SEQ ID NO: 30)

		AGGATCTCCACAGTACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 31)
8	A175L	GGTGTGTACTTGGGAGATCCTCAACAGCTC (SEQ ID NO: 32)
		AGGATCTCCCAAGTACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 33)
9	V318M	TATCCAACAATGGCTTCAGTTGTGTTGGCA (SEQ ID NO: 34)
		AACTGAAGCCATTGTTGGATAAGTGAATGC (SEQ ID NO: 35)
10	G351A	CGCTGTCTCGCTACGATTTGGACATCGAGT (SEQ ID NO: 36)
		CCAAATCGTAGCGAGACAGCGAATTCCCTG (SEQ ID NO: 37)
11	S63T	GCCCGAACACTTTTTCGCCGACGCCGGAATTG (SEQ ID NO: 38)
		GGCGAAAAAGTGTTCTGGGCCCTCCTCCCAG (SEQ ID NO: 39)
12	R92A	CAAATTGCCTGCTTTTGTGTATTGGGAAAATAAG (SEQ ID NO: 40)
		ATACACAAAAGCAGGCAATTTGCGATCGGC (SEQ ID NO: 41)
13	V173S	GTTTCTGGGAGTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 42)
		CCGGCATAACTCCCAGAAACAAAAGGTTCC (SEQ ID NO: 43)
14	V173C	GTTTCTGGGTGTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 44)
		CCGGCATAACACCCAGAAACAAAAGGTTCCAC (SEQ ID NO: 45)
15	V173T	GTTTCTGGGACTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 46)
		CCGGCATAAGTCCCAGAAACAAAAGGTTCCAC (SEQ ID NO: 47)

16	L229F	ACTAAGCCGGGGGAGTTCGGTTCGTTCAAGCAG (SEQ ID NO: 48)
		CTGCTTGAACGAACCGAACTCCCCGGCTTAGT (SEQ ID NO: 49)
17	L340I	TTTTGGAAATATAATTCCGAGGGGGCAGGG (SEQ ID NO: 50)
		CTCGGAATTATATTTCCAAAACCCACTAATTTAC (SEQ ID NO: 51)
18	I353T	TCGGGACGACTTGGACATCGAGTTTATTTCC (SEQ ID NO: 52)
		GATGTCCAAGTCGTCCCGAGACAGCGAATTC (SEQ ID NO: 53)
19	I353L	CTCGGGACGCTTTGGACATCGAGTTTATTT (SEQ ID NO: 54)
		ATGTCCAAAGCGTCCCGAGACAGCGAATTC (SEQ ID NO: 55)
20	I353V	ACTAAGCCGGGGGAGTTCGGTTCGTTCAAGCAG (SEQ ID NO: 56)
		CTGCTTGAACGAACCGAACTCCCCGGCTTAGT (SEQ ID NO: 57)
21	I353C	TCGGGACG TGT TGGACATCGAGTTTATTTCC (SEQ ID NO: 58)
		GATGTCCA ACA CGTCCCGAGACAGCGAATTC (SEQ ID NO: 59)
22	V318T	TATCCTACGACTGCCTCCGTTGTCTTAGCA (SEQ ID NO: 60)
		AACGGAGGCAGTCGTAGGATAAGTAAAAGC (SEQ ID NO: 61)
23	E228A	AAAATAAGCCGGGGGCGTTGGGTTCGTTCAAG (SEQ ID NO: 62)
		CTTGAACGAACCCAACGCCCCGGCTTAGTTTT (SEQ ID NO: 63)
24	P91L	AAACTTCTTAGATTCGTGTATTGGGAAAAC (SEQ ID NO: 64)

		ACGAATCTAAGAAGTTTTCTATCTGCGAAT (SEQ ID NO: 65)
25	P316A+V318L	GCTTTTACTTATGCTACGCTTGCCTCCGTT (SEQ ID NO: 66)
		GACAACGGAGGCAAGCGTAGCATAAGTAAA (SEQ ID NO: 67)
26	P316L+V318L	GCTTTTACTTATCTTACGCTTGCCTCCGTT (SEQ ID NO: 68)
		GACAACGGAGGCAAGCGTAAGATAAGTAAA (SEQ ID NO: 69)
27	F337V	TTAGTGGGTGTTGGAAATTTAATTCCGAGGGG (SEQ ID NO: 70)
		TAAATTTCCAACACCCACTAATTACCCTTGAC (SEQ ID NO: 71)
28	T352V	TGTCTCGGGGTGATTTGGACATCGAGTTTATTT (SEQ ID NO: 72)
		GTCCAAATCACCCCGAGACAGCGAATTCCTG (SEQ ID NO: 73)
29	V173L	GTTTCTGGGCTTTATGCCGGCGATCCGCAAC (SEQ ID NO: 74)
		CGGCATAAAGCCCAGAAACAAAAGGTTCCAC (SEQ ID NO: 75)
30	A175I	GTTTCTGGGGTTTATATTGGCGATCCGCAA (SEQ ID NO: 76)
		TTGTTGCGGATCGCCAATATAAACCCAGAG (SEQ ID NO: 77)
31	L340V	TTTTGGAAATGTTATTCCAAGAGGTCAAGGAATC (SEQ ID NO: 78)
		CTTGGAATAACATTTCCAAAACCCACGAGTTT (SEQ ID NO: 79)
32	L340T	TTTTGGAAATACTATTCCAAGAGGTCAAGG (SEQ ID NO: 80)
		CTTGGAATAGTATTTCCAAAACCCACGAGTTTTC (SEQ ID NO: 81)

33	F169A	CCAGAAACAGCAGGTTCCACCAACCGCTGCATC (SEQ ID NO: 82)
		GTGGAACCTGCTGTTTCTGGGGTTTATGCCG (SEQ ID NO: 83)

Bảng 3

Đoạn môi để Đột biến CyPPO4

Số	Đột biến CyPPO4	Đoạn môi (Xuôi: trên; Ngược: dưới) (5'->3')
1	Y375M	CTTACATCTATGATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 84)
		CCACCAATCATAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 85)
2	Y375V	CTTACATCTGTTATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 86)
		CCACCAATAACAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 87)
3	Y375I	CTTACATCTATCATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 88)
		CCACCAATGATAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 89)
4	Y375T	CTTACATCTACCATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 90)
		CCACCAATGGTAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 91)
5	Y375C	CTTACATCTTGTATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 92)
		CCACCAATACAAGATGTAAGAACCTGCCAT (SEQ ID NO: 93)
6	A176C	GGTGTGTATTGTGGAGATCCACAACAGCTT (SEQ ID NO: 94)

		TGGATCTCCACAATACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 95)
7	A176L	GGTGTGTATTTGGGAGATCCACAACAGCTT (SEQ ID NO: 96)
		TGGATCTCCCAAATACACACCAGAAACAAA (SEQ ID NO: 97)
8	P318L+V320L	ATTCCTTATTTGCCATTGGCTTGTGTTGTGCTC (SEQ ID NO: 98)
		AACACAAGCCAATGGCAAATAAGGAATTTCTGTA (SEQ ID NO: 99)
9	V320M	TATCCTCCAATGGCTTGTGTTGTGCTCGCA (SEQ ID NO: 100)
		AACACAAGCCATTGGAGGATAAGGAATTTTC (SEQ ID NO: 101)
10	P318A+V320L	ATTCCTTATGCTCCATTGGCTTGTGTTGTGCTC (SEQ ID NO: 102)
		AACACAAGCCAATGGAGCATAAGGAATTTCTGTA (SEQ ID NO: 103)

Bảng 4

Đoạn môi để đột biến CyPPO8

Số	Đột biến CyPPO8	Đoạn môi (Xuôi: trên; Ngược: dưới)
1	F363M	TTGACAAATATGATTGGTGGAGCTACCGAT (SEQ ID NO: 104)
		CACCAATCATATTTGTCAAAAGGTGCCATC (SEQ ID NO: 105)
2	F363V	CTT TTG ACA AAT GTT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 106)
		AGC TCC ACC AAT AAC ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 107)

3	F363L	CTT TTG ACA AAT CTT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 108)
		AGC TCC ACC AAT AAG ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 109)
4	F363C	CTT TTG ACA AAT TGT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 110)
		AGC TCC ACC AAT ACA ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 111)
5	A162C	TCTGGTGTGTAT TGT GGAGATGTTGATCAA (SEQ ID NO: 112)
		ATCAACATCTCC ACA ATACACACCAGAAAC (SEQ ID NO: 113)
6	A162L	TCTGGTGTGTAT CTT GGAGATGTTGATCAA (SEQ ID NO: 114)
		ATCAACATCTCC AAG ATACACACCAGAAAC (SEQ ID NO: 115)
7	P306L+V308 L	ATCTCATAT CTT CCA CTT GCTTGCGTTGTG (SEQ ID NO: 116)
		AACGCAAGC AAG TGG AAG ATATGAGATTTC (SEQ ID NO: 117)
8	V308M	TCATATCCTCCA ATG GCTTGCGTTGTGCTC (SEQ ID NO: 118)
		CACAACGCAAGC CAT TGGAGGATATGAGAT (SEQ ID NO: 119)
9	P306A+V308 L	ATTCCTATGCCCCCTAGCTTGTGTGGTCTTAGCC (SEQ ID NO: 120)
		CACACAAGCTAGGGGGGCATAGGAAATTCGTTTAA GG (SEQ ID NO: 121)
10	V160S	GTGTCTGGGTCTTATGCAGGGGATGTGGATC (SEQ ID NO: 122)
		CCTGCATAAGACCCAGACACAAACGGACTCAC (SEQ ID NO: 123)
11	I343T	TTGGTACAACCTGGAGTTCAACACTCTTTCC (SEQ ID NO: 124)

		GAACTCCAAGTTGTACCAAGAGTGCGGATTC (SEQ ID NO: 125)
12	F363I	CTT TTG ACA AAT ATT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 126)
		AGC TCC ACC AAT AAT ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 127)
13	F363T	CTT TTG ACA AAT ACT ATT GGT GGA GCT ACC (SEQ ID NO: 128)
		AGC TCC ACC AAT AGT ATT TGT CAA AAG GTG (SEQ ID NO: 129)
14	R85A	GGACTTCCCGCTTATGTTTATTGGGAGGGG (SEQ ID NO: 130)
		CAATAAACATAAGCGGGAAGTCCGCGATCAGC (SEQ ID NO: 131)
15	I343V	CTTGGTACAGTTTGGAGTTCAACACTCTTTC (SEQ ID NO: 132)
		AACTCCAAACTGTACCAAGAGTGCGGATTC (SEQ ID NO: 133)
16	P84L	AGGTTTACTTAGGTATGTTTACTGGGAGGG (SEQ ID NO: 134)
		CATACCTAAGTAAACCTCTATCTGCAAAGA (SEQ ID NO: 135)
17	R85C	GACTTCCCTGTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 136)
		TAAACATAACAGGGAAGTCCGCGATCAGCAAAG (SEQ ID NO: 137)
18	R85H	ACTTCCCCATTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 138)
		CAATAAACATAATGGGGAAGTCCGCGATCAGC (SEQ ID NO: 139)
19	R85L	ACTTCCCCTTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 140)
		CAATAAACATAAAGGGGAAGTCCGCGATCAGC (SEQ ID NO: 141)

20	R85T	GACTTCCCCTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 142)
		ATAAACATAAGTGGGAAGTCCGCGATCAGCAAAG (SEQ ID NO: 143)
21	R85V	GACTTCCCCTTATGTTTATTGGGAGGGGAAAC (SEQ ID NO: 144)
		ATAAACATAAACGGGAAGTCCGCGATCAGCAAAG (SEQ ID NO: 145)
22	F156A	GTGAGTCCGGCTGTGTCTGGGGTTTATGCA (SEQ ID NO: 146)
		CCCAGACACAGCCGGACTCACTAACCGTTG (SEQ ID NO: 147)
23	V160C	CCGTTTGTGTCTGGGTGCTATGCAGGGGATGTG (SEQ ID NO: 148)
		CACATCCCCTGCATAGCACCCAGACACAAACGG (SEQ ID NO: 149)
24	Q179G	TCCGCCAGTCCGGTAACTCGTCCAAATGCAG (SEQ ID NO: 150)
		CGAGTTACCGGACTGGCGGATGTGGGCGGTG (SEQ ID NO: 151)
25	F327V	GTTTTCCCCTCAAAGGAGTGGGTAATCTTAACCCTC (SEQ ID NO: 152)
		GAGGGTTAAGATTACCCACTCCTTTGAGGGGAAAAC (SEQ ID NO: 153)
26	L330T	TTTGGTAATACTAACCCTCGCAGTCAAGGA (SEQ ID NO: 154)
		GCGAGGGTTAGTATTACCAAATCCTTTGAG (SEQ ID NO: 155)
27	F363M+N362 S	CTTTTGACATCAATGATTGGTGGAGCTACC (SEQ ID NO: 156)
		CCAATCATTGATGTCAAAAGGTGCCATCCT (SEQ ID NO: 157)

Cụm nấm đơn của *E. coli* được biến nạp với mỗi gen CyPPO được nuôi cấy trong 3 ml canh LB chứa cloramphenicol qua đêm (220 rpm, 37°C), và sau đó mỗi giống cấy được nuôi cấy lại với môi trường mới cho tới khi hệ số hấp thụ (OD_{600}) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1. Nó được pha loãng bằng canh LB để hệ số hấp thụ (OD_{600}) là 0,5. Tương tự, dung dịch được pha loãng được pha loãng liên tục 5 lần theo hệ số 0,1. Tiếp theo, 10 μ l mỗi dung dịch được pha loãng được nhỏ giọt lên môi trường thạch agar LB chứa cloramphenicol (34 μ g/ml) và nồng độ 0~400 μ M tiafenacil. Môi trường thạch agar LB được nuôi cấy ở 37°C dưới điều kiện ánh sáng, và mức ức chế sinh trưởng được đánh giá sau 16 đến 20 giờ.

Thuốc diệt cỏ được sử dụng trong thử nghiệm được nêu ở bảng 5:

Bảng 5

Họ	Thuốc diệt cỏ
Thuốc diệt cỏ gốc pyrimidindion	Tiafenacil
	Saflufenacil
Thuốc diệt cỏ gốc diphenyl ete	Fomesafen
	Acifluorfen
Thuốc diệt cỏ gốc N-phenylphtalimit	Flumioxazin
Thuốc diệt cỏ gốc triazolinon	Sulfentrazon
Thuốc diệt cỏ gốc oxazolidinedion	Pentoxazon
Thuốc diệt cỏ gốc phenylpyrazol	Pyraflufen-etyl
Khác	Pyraclonil

Các kết quả được thể hiện ở các bảng từ 6 đến 8 và FIG. 5 đến FIG. 25.

Bảng 6

Mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tạo ra bằng đột biến CyPPO2

CyPPO2	Tiafenacil	Saflufenacil	Flumioxazin
CyPPO2 (kiểu đại)	-	-	-
Y373M+G351A	+++++	+++++	+++++
Y373C	++++	+++++	+++++
Y373I	++++	+++++	+++++
Y373L	++++	+++++	+++++
Y373M	++++	+++++	+++++
Y373T	++++	+++++	+++++
Y373V	+++	+++++	+++++
A175C	+++	++++	+++++
A175L	++	+++++	++++
V318M	++	++++	+++++
P316A+V318L	+	NT	NT
P316L+V318L	+	NT	NT
F337V+Y373M	++	NT	NT
T352V+Y373M	++++	NT	NT
G351A+T352V+Y373M	+++	NT	NT
P91L+Y373M	++	NT	NT

(NT: Không được thử nghiệm)

Bảng 7

Mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tạo ra bằng đột biến CyPPO4

CyPPO4	Tiafenacil	Saflufenacil	Flumioxazin
CyPPO4	-	-	-

Y375M	+++++	+++++	+++++
Y375V	+++++	+++++	+++++
Y375I	+++++	+++++	+++++
Y375T	+++++	+++	+++++
Y375C	+++++	+++	NT
A176C	+++++	+++++	+++++
A176L	+++++	++++	+++++
P318L+V320L	+++++	++++	NT
V320M	+++++	++++	NT
P318A+V320L	+++++	++++	NT

(NT: Không được thử nghiệm)

Bảng 8

Mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tạo ra bằng đột biến CyPPO8

CyPP O8	Tiafe nasil	Saflu fenac il	Fom esafe n	Acifl uorfe n	Flum ioxaz in	Sulfe ntraz on	Pent oxaz on	Pyraf lufen- etyl	Pyracl onil
CyPP O8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F363C	++++	++++	++++	++++ +	+++	++++	++++ +	++++ +	+++++
F363L	+++	+++	+	+++	++	++	++++ +	++++	++++
F363 M	+++	+++	+	+++	++	++	++++ +	++++	++++
F363V	+++	+++	-	++	+++	++	++++ +	++++	+++++
A162L	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
V308 M	++	++	+++	++++ +	+++	++++	++++	++++	++++

P306A +V308 L	+	+	+	++++	NT	++	+++	+++	+
P306L +V308 L	+	+	++	++++ +	NT	++++	+++	++++	+
A162 C	NT	NT	NT	++	NT	+	+++	++++	+
P84L+ F363 M	+++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
N362S +F363 M	+++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

(NT: Không được thử nghiệm)

Các bảng từ 6 đến 8 thể hiện các kết quả đánh giá khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của kiểu đại và biến thể PPO. Mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của kiểu đại được thể hiện bởi "-", và mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được chia bằng cách thể hiện mức khả năng chống chịu bằng nhau bằng "-", và nếu cao hơn, thêm "+" đến tối đa "+++++".

FIG. 5 đến FIG. 25 thể hiện các kết quả của *E. coli* được biến nạp với gen CyPPO2 (kiểu đại và biến thể), và nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ được mô tả trên đỉnh. Cột bên trái ngoài cùng là kết quả của dung dịch nuôi cấy *E. coli* OD₆₀₀=0,5, và năm cột tiếp theo được pha loãng 5 lần theo hệ số 0,1.

Như được thể hiện ở bảng 6 và FIG. 5 đến FIG. 13, thể biến nạp kiểu đại CyPPO2 (sau đây, được thể hiện bởi 'Cy2 WT'; đối chứng) thể hiện ức chế sinh trưởng nhanh từ 25µM hoặc 50µM xử lý tiafenacil thuốc diệt cỏ gốc pyrimidindion, nhưng ức chế sinh trưởng thể biến nạp trong đó gen đột biến là Y373C, Y373I, Y373L, Y373M, Y373T, Y373V, A175C, A175L, V318M, G351A+Y373M, P316A+V318L, P316L+V318L, Y373M+F337V, Y373M+T352V, Y373M+G351A+T352V, và Y373M+P91L được đưa lần lượt không quan sát được ngay cả ở nồng độ tối đa (200 µM) (FIG. 5). Khi saflufenacil thuốc diệt cỏ gốc pyrimidindion khác được xử lý, Cy2 WT cũng thể hiện ức chế sinh trưởng ở 100 µM hoặc nồng độ cao hơn, nhưng thể biến nạp trong đó gen đột

biến là Y373C, Y373I, Y373L, Y373M, Y373T, Y373V, A175C, A175L, V318M, và G351A+Y373M được đưa lần lượt không quan sát được ngay cả ở nồng độ tối đa (200 μ M) (FIG. 6). Khi flumioxazin thuốc diệt cỏ gốc N-phenylphthalimit được xử lý, quá trình ức chế sinh trưởng Cy2 WT được bắt đầu từ nồng độ 25 μ M xử lý thuốc diệt cỏ, nhưng việc ức chế sinh trưởng thể biến nạp trong đó gen đột biến là Y373C, Y373I, Y373L, Y373M, Y373T, Y373V, A175C, A175L, V318M, và G351A+Y373M được đưa lần lượt không quan sát được ở nồng độ tối đa (200 μ M) (FIG. 7).

Như được thể hiện ở bảng 7 và FIG. 14 đến FIG. 16, khi tiafenacil được xử lý, gen kiểu đại CyPPO4 được đưa (sau đây, được thể hiện bởi 'Cy4 WT'; đối chứng) thể hiện việc ức chế sinh trưởng từ 100 μ M thuốc diệt cỏ được xử lý, nhưng việc ức chế sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là A176L, A176C, P318L+V320L, P318A+V320L, V320M, Y375I, Y375T, Y375V, Y375M, và Y375C được đưa lần lượt không quan sát được ở nồng độ tối đa (200 μ M) (FIG. 14). Khi saflufenacil được xử lý, Cy4 WT thể hiện việc ức chế sinh trưởng từ 100 μ M xử lý thuốc diệt cỏ, nhưng việc ức chế sinh trưởng thể biến nạp trong đó gen đột biến là Y375C, Y375I, Y375M, Y375T, Y373V, A176C, A176L, P318L+V320L, P318A+V320L, và V320M được đưa lần lượt không quan sát được ở nồng độ tối đa (200 μ M) (FIG. 15). Khi flumioxazin được xử lý, việc ức chế sinh trưởng của Cy4 WT quan sát được từ nồng độ 200 μ M xử lý thuốc diệt cỏ, nhưng việc ức chế sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là Y375I, Y375M, Y375T, Y373V, A176C, và A176L được đưa lần lượt không quan sát được (FIG. 16).

Như được thể hiện ở bảng 8 và FIG. 17 đến FIG. 25, khi tiafenacil hoặc saflufenacil được xử lý, gen kiểu đại CyPPO8 được đưa (sau đây, được thể hiện bởi 'Cy8 WT'; đối chứng) thể hiện không sinh trưởng từ nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 5 μ M, sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, F363V, A162L, V308M, P306A+V308L, P306L+V308L, F363M+P84L, và F363M+N362S được đưa lần lượt quan sát được ngay cả ở nồng độ tối thiểu 25 μ M hoặc cao hơn (FIG. 17 và FIG. 18). Khi fomesafen thuốc diệt cỏ gốc diphenyl-ete được xử lý, Cy8 WT thể hiện không sinh trưởng từ nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 25 μ M, nhưng sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, A162L, V308M, P306A+V308L, và P306L+V308L được đưa lần lượt quan sát được ở nồng độ 25 μ M

hoặc cao hơn (FIG. 19). Khi acifluorfen thuốc diệt cỏ gốc diphenyl-ete khác được xử lý, Cy8 WT thể hiện không sinh trưởng từ nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 50 μ M, nhưng sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, và P306L+V308L được đưa lần lượt quan sát được ở nồng độ 50 μ M hoặc cao hơn (FIG. 20). Khi flumioxazin được xử lý, Cy8 WT thể hiện không sinh trưởng từ nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 5 μ M, nhưng sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, F363V, A162L, và V308M được đưa lần lượt quan sát được ở nồng độ 25 μ M hoặc cao hơn (FIG. 21). Khi sulfentrazone thuốc diệt cỏ gốc triazolinon được xử lý, Cy8 WT thể hiện sinh trưởng chỉ bằng nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 25 μ M, nhưng sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, và P306L+V308L được đưa lần lượt quan sát được ở nồng độ 50 μ M hoặc cao hơn (FIG. 22). Khi pentoxazon hoặc pyraflufen-etyl được xử lý, Cy8 WT thể hiện không sinh trưởng từ nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 5 μ M, nhưng sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, và P306L+V308L được đưa lần lượt quan sát được ở nồng độ tối đa (200 μ M) (FIG. 23 và FIG. 24). Khi pyraclonil được xử lý, Cy8 WT thể hiện không sinh trưởng từ nồng độ xử lý thuốc diệt cỏ 25 μ M, nhưng sự sinh trưởng của thể biến nạp trong đó gen đột biến là F363C, F363L, F363M, F363V, A162C, A162L, V308M, P306A+V308L, P306L+V308L được đưa lần lượt quan sát được ở nồng độ tối đa (200 μ M) (FIG. 25).

Ví dụ 4: Đo hoạt tính enzym và giá trị IC_{50} bằng thuốc diệt cỏ của kiểu đại PPO và biến thể

Hoạt tính enzym của biến thể trong đó axit amin của một số vị trí nhất định của protein PPO được tạo đột biến để tăng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được kiểm tra và phân tích ức chế cho thuốc diệt cỏ ức chế PPO được tiến hành. Được xác nhận rằng protein PPO có độ tan trong nước thấp, nhưng khi protein PPO được dung hợp với MBP (protein liên kết maltoza) (MBP-PPO), nó tan trong nước và được biểu hiện ổn định. Do đó, kiểu đại và protein biến thể mà được biểu hiện ở dạng protein dung hợp với MBP được sử dụng ở thử nghiệm theo sáng chế (tham chiếu đến FIG. 26).

Để tách dòng gen kiểu dại và gen biến thể của CyPPO2, CyPP04, và CyPPO8 (tham chiếu đến ví dụ 1 và ví dụ 2), các gen đó được đưa vào vector pMAL-c2X (tham chiếu đến FIG. 27) lần lượt, và sau đó được biểu hiện ở BL21-CondonPlus (DE3) *E. coli* (CodonPlus).

E. coli được biến nạp được nuôi cấy dưới điều kiện sau đây để biểu hiện gen PPO được đưa:

Cảm ứng: OD₆₀₀=0,2, bổ sung IPTG vào 0,3 mM nồng độ cuối;

Nhiệt độ biểu hiện: 23°C, môi trường nuôi cấy lắc 200rpm;

Thời gian biểu hiện: 16 hrs;

Quy mô môi trường nuôi cấy: 200 ml/ bình 1000 ml.

Sự tiêu tế bào và chiết protein được thực hiện bằng quy trình sau đây với tế bào được nuôi cấy:

Chất đệm chiết: Cột chất đệm (50 mM Tris-Cl, độ pH 8,0, 200 mM NaCl) 5 ml chất đệm/g tế bào;

Nghiền bằng sóng âm: SONICS&VẬT LIỆU VCX130 (130 watt);

15 sec ON, 10 sec OFF cho 5 min trên đá;

Ly tâm trong điều kiện 4°C trong 20 phút (20000 xg); và dịch nổi thu được bằng cách ly tâm được pha loãng theo tỷ lệ 1:6 sử dụng cột chất đệm.

Quy trình tinh sạch protein PPO sau đây được thực hiện trong phòng lạnh 4°C. Nhựa amyloza (New England Biolabs) được đóng gói thành cột 1,5x15 cm (Cột Bio-Rad Econo 1,5 x 10 cm, cột sắc ký thủy tinh, max. vol), và phần chiết protein thu được được nạp vào cột ở tốc độ dòng 0,2 ml/min. Cột được rửa bằng 3 thể tích cột chất đệm và lượng protein trong dung dịch rửa được kiểm tra. Khi protein không còn được phát hiện, quá trình rửa được chấm dứt. Sau đó, protein MBP-PPO được rửa giải bằng khoảng 2 thể tích cột chất đệm chứa 20 mM maltoza. Nồng độ protein của mỗi dung môi rửa giải được xác định và quá trình tách rửa được dừng khi protein không còn được phát hiện. Mười microlit mỗi phần được nghiên cứu để định lượng protein và phân tích SDS-PAGE. Các phần tinh khiết cao của biến thể protein PPO (ví dụ, CyPPO2-Y373M, CyPPO4-Y375M, CyPPO8-F363M) được lấy để phân tích enzym.

Phân tích SDS-PAGE mỗi PPO được thể hiện trên FIG. 28 đến FIG. 30. Tham chiếu đến kết quả được thể hiện trên FIG. 28, protein kiểu đại CyPPO2 (quá trình tách rửa 7, lần 2) và CyPPO2-Y373M (quá trình tách rửa 5, lần 7) được lấy và sử dụng để phân tích hoạt tính enzym.

Đề cập đến kết quả được thể hiện trên FIG. 29, như với protein kiểu đại CyPPO4 (quá trình tách rửa 3, lần 2) và CyPPO4-Y375M (quá trình tách rửa 3, lần 6) được lấy và sử dụng để phân tích hoạt tính enzym.

Đề cập đến kết quả được thể hiện trên FIG. 30, protein kiểu đại CyPPO8 (quá trình tách rửa 9, lần 3) và CyPPO8-F363M (quá trình tách rửa 4, lần 6) được lấy và được sử dụng để phân tích hoạt tính enzym.

Hoạt tính enzym của protein kiểu đại đã tinh chế và protein biến thể của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 được đo bằng quy trình sau đây.

Tất cả quy trình được thực hiện trong bóng tối dưới dòng nitơ. Vì protoporphyrinogen IX, cơ chất của protein PPO không có bán trên thị trường, nó được tổng hợp hóa học trong phòng thí nghiệm. Sáu microgam protoporphyrin IX được hòa tan trong 20 ml EtOH 20% (v/v), và được khuấy dưới điều kiện bóng tối trong 30 phút. Dung dịch protoporphyrin IX thu được được đặt vào ống hình vít 15 ml với lượng 800 μ l, và được làm cho đều bằng khí nitơ trong 5 phút. 1 g natri amalgam được bổ sung vào và lắc mạnh trong 2 phút. Nắp được mở để thải khí hydro trong ống. Sau đó, nắp được đóng và ủ trong 3 phút. Dung dịch protoporphyrinogen IX được lọc sử dụng bơm tiêm và thiết bị lọc màng xenluloza. Khoảng 300 μ l MOPS [axit 3-(N-morpholino)propanesulfonic] 2M được bổ sung vào 600 μ l dung dịch protoporphyrinogen IX thu được để điều chỉnh độ pH đến 8,0. Để xác định hoạt tính enzym của protein PPO, hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị với chế phẩm sau đây (trên cơ sở 10 ml): 50 mM Tris-Cl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 0,04% (v/v) Tween 20; 40 mM glucoza (0,072 g); 5 đơn vị glucoza oxidaza (16,6 mg); và 10 đơn vị catalaza (1 μ l).

Hai trăm microlit hỗn hợp phản ứng chứa được protein PPO tinh chế được đặt trong bảng 96 lỗ và được ủ trước trong 30 min ở nhiệt độ phòng để giảm nồng độ oxy bằng phản ứng liên hợp của glucoza oxidaza-catalaza. Dầu khoáng được phân lớp và sau đó phản ứng được bắt đầu bằng cách thêm cơ chất, dung dịch protoporphyrinogen IX vào nồng độ cuối 50 μ M. Phản ứng được xử lý ở nhiệt độ phòng trong 30 min và

huỳnh quang của protoporphyrin IX được đo sử dụng Microplate reader (Sense, Hidex) (kích thích: 405 nm; phát: 633 nm). Để tính toán hoạt tính enzym PPO, dung dịch protoporphyrinogen IX được giữ mở trong không khí để oxy hóa dung dịch (qua đêm). 2,7 N HCl được bổ sung vào, và hệ số hấp thụ ở 408 nm được đo. Sóng tiêu chuẩn được tạo thành sử dụng protoporphyrin IX tiêu chuẩn, và hoạt tính PPO được đo bằng cách hiệu chuẩn protoporphyrin IX sử dụng sóng protoporphyrin IX tiêu chuẩn.

Hoạt tính enzym của kiểu đại PPO và biến thể thu được được thể hiện ở bảng 10 và 11.

Các giá trị hằng số Michaelis-Menten (K_m) và vận tốc tối đa (V_{max}) của mỗi enzym được tính để đánh giá nghiên cứu động lực của CyPPO2 và CyPPO8. Vận tốc phản ứng ban đầu được đo trong đó vận tốc phản ứng cân xứng với nồng độ bằng cách thay đổi nồng độ cơ chất. Lượng protoporphyrin IX được đề xuất mà là sản phẩm phản ứng enzym được đo theo dòng thời gian ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Các giá trị K_m và V_{max} được tính bằng chương trình phân tích động lực enzym bằng phương trình Michaelis-Menten. Kiểu đại AtPPO1 được sử dụng làm đối chứng. Kết quả được thể hiện ở bảng 9:

Bảng 9

Xác định K_m và V_{max} của CyPPO2 và CyPPO8

	CyPPO2	CyPPO8	AtPPO1
$K_m(\mu M)$	$9,1 \pm 0,5$	$7,7 \pm 0,2$	$9,6 \pm 1,8$
V_{max} (μM mg protein-1 min-1)	285 ± 15	305 ± 10	135 ± 19

Từ các kết quả, giá trị K_m của CyPPO2 và CyPPO8 thấp hơn của AtPPO1, xác nhận rằng mối quan hệ giữa enzym và cơ chất tốt hơn, trong khi giá trị V_{max} của CyPPO2 và CyPPO8 cao hơn hai lần của AtPPO1. Kết luận, protein PPO của CyPPO2 và CyPPO8 thể hiện khả năng làm enzym PPO tốt hơn AtPPO1 thu được từ cây trồng.

Ngoài ra, nồng độ của thuốc diệt cỏ ức chế PPO mà ức chế hoạt tính enzym PPO của mỗi kiểu đại PPO và biến thể khoảng 50% (IC_{50}) được đo cho mỗi thuốc diệt cỏ.

Nồng độ cuối của mỗi thuốc diệt cỏ như sau:

- Tiafenacil, saflufenacil, fomesafen, butafenacil, flumioxazin và sulfentrazone: 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000 nM

Giá trị IC_{50} được tính là nồng độ thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính enzym PPO đến 50% trước khi thêm thuốc diệt cỏ ở nồng độ ở trên.

Các giá trị IC_{50} của các thuốc diệt cỏ khác nhau được thể hiện ở bảng 10 và 11 sau đây.

Bảng 10

CyP PO2	Vị trí đột biến	Hoạt tính (%)	IC_{50} (nM)					
			Tiafenacil	Saflufenacil	Fomesafen	Butafenacil	Flumioxazin	Sulfentrazone
	WT	100	25	50	182	13	122	NT
1	Y373M	90	250	5,000	395	63	136	NT
2	Y373I	75	639	5,000	70	1516	464	NT
3	Y373L	44	300	NT	NT	NT	NT	NT
4	Y373V	35	525	NT	NT	NT	NT	NT
5	Y373C	39	225	NT	NT	NT	NT	NT
6	Y373T	10	2500	NT	NT	NT	NT	NT
7	A175L	41	230	NT	NT	NT	NT	NT
8	S63T+ Y373M	90	246	NT	NT	NT	NT	NT
9	R92A+ Y373M	50	219	NT	NT	NT	310	NT
10	V173S + Y373M	80	430	NT	NT	NT	NT	NT
11	V173S +	25	610	NT	NT	NT	NT	NT

	Y373I							
12	V173S + Y373L	40	530	NT	NT	NT	NT	NT
13	V173S + Y373V	10	1,000	NT	NT	NT	NT	NT
14	V173C +Y373 M	53	680	NT	NT	NT	NT	NT
15	V173C +Y373I	28	915	NT	NT	NT	NT	NT
16	V173T + Y373M	15	543	NT	NT	NT	NT	NT
17	V173T + Y373I	25	1,500	NT	NT	NT	NT	NT
18	V173L + Y373M	83	290	NT	NT	NT	NT	NT
19	A175L + Y373M	62	4500	5000	1720	4000	5000	5000
20	A175L + Y373I	15	2000	5000	NT	NT	NT	NT
21	A175C +Y373 M	83	3700	5000	770	2500	372	5000
22	A175C +Y373I	31	2000	NT	NT	NT	NT	NT
23	A175I+ Y373M	52	2,500	NT	NT	NT	NT	NT

24	E228A + Y373M	85	214	NT	NT	NT	NT	NT
25	L229F+ Y373T	10	1,800	NT	NT	NT	NT	NT
26	V318M +Y373 M	73	456	5,000	523	708	210	3776
27	V318M +Y373I	50	2765	5,000	145	1232	1021	5000
28	V318M +Y373 V	42	2140	5000	NT	NT	NT	NT
29	V318T + Y373I	25	1500	NT	NT	NT	NT	NT
30	L340I+ Y373M	80	259	NT	NT	NT	NT	NT
31	L340I+ Y373I	85	584	NT	NT	NT	NT	NT
32	L340V + Y373M	80	257	NT	NT	NT	NT	NT
33	G351A +Y373 M	23	706	5000	300	36	NT	NT
34	I353T+ Y373M	32	1152	NT	NT	NT	NT	NT
35	I353T+ Y373I	20	1300	NT	NT	NT	NT	NT
36	I353T+ Y373L	10	3000	NT	NT	NT	NT	NT

37	I353L+ Y373M	80	271	NT	NT	NT	NT	NT
38	I353V+ Y373M	63	445	NT	NT	NT	NT	NT
39	I353C+ Y373M	12	550	NT	NT	NT	NT	NT
40	S63T+ V173S + Y373M	60	430	NT	NT	NT	NT	NT
41	S63T+ V173S + Y373I	60	427	NT	NT	NT	NT	NT
42	S63T+ I353T+ Y373M	15	278	NT	NT	NT	NT	NT
43	S63T+ I353T+ Y373I	5	1200	NT	NT	NT	NT	NT
44	V173S + V318M +Y373 M	5	3000	NT	NT	NT	NT	NT
45	V173T + L340I+ Y373M	50	518	NT	NT	NT	NT	NT
46	V173S +A175 C +Y373 M	38	5000	5000	758	2591	5000	5000

47	A175C +V318 M+Y37 3M	47	3793	5000	2033	1475	419	5000
48	A175L + V318M +Y373 M	40	3100	NT	NT	NT	NT	NT
49	A175C + I353L+ Y373M	5	1900	NT	NT	NT	NT	NT
50	A175C + I353V+ Y373M	69	2310	NT	NT	NT	NT	NT
51	R92A	66	125	NT	NT	NT	NT	NT
52	F169A	72	57	NT	NT	NT	NT	NT
53	V173C	68	79	NT	NT	NT	NT	NT
54	A175C	86	100	NT	NT	NT	NT	NT
55	A175L	68	325	NT	NT	NT	NT	NT
56	V318M	76	140	NT	NT	NT	NT	NT
57	F337V	20	148	NT	NT	NT	NT	NT
58	L340T	18	56	NT	NT	NT	NT	NT
59	I353T	40	162	NT	NT	NT	NT	NT
CyP PO4								
	WT	100	22	33	28	10	NT	NT
1	Y375M	95	124	5000	133	39	NT	NT

(NT: không được thử nghiệm)

Bảng 11

Cy PP O8	Vị trí đột biến	Hoạt tính (%)	IC ₅₀ (nM)					
			Tiafenac il	Saflufen acil	Fomesaf en	Butafena cil	Flumiox azin	Sulfentr azon
	WT	100	4	11	13	2,8	NT	NT
1	F363M	100	183	5000	163	30	266	NT
2	F363C	17	36	500	38	53	NT	NT
3	F363V	15	2000	5000	1500	250	2500	NT
4	F363L	54	322	NT	NT	NT	NT	NT
5	F363I	62	698	5000	133	NT	1100	NT
6	F363T	5	3000	5000	1,500	NT	2500	NT
7	R85A + F363M	62	700	NT	NT	NT	NT	NT
8	R85A + F363I	40	2350	NT	NT	NT	NT	NT
9	A162L + F363M	17	5000	NT	NT	NT	5000	NT
10	A162C + F363M	87	2500	5000	NT	NT	1166	NT
11	V160S + F363M	58	500	NT	NT	NT	NT	NT
12	V160S + F363I	26	2280	NT	NT	NT	NT	NT

13	V308 M + F363M	81	1017	5000	NT	NT	210	NT
14	V308 M + F363I	29	1810	NT	NT	NT	NT	NT
15	I343T + F363M	10	2100	NT	NT	NT	NT	NT
16	I343V + F363M	44	288	NT	NT	NT	NT	NT
17	R85A + V308 M + F363M	39	2347	5000	NT	NT	NT	NT
18	V160S + V308 M + F363I	5	4000	NT	NT	NT	NT	NT
19	A162C + F363I	29	2450	NT	NT	NT	NT	NT
20	A162C + F363L	6	5000	NT	NT	NT	NT	NT
21	R85A + A162L + F363M	11	5000	NT	NT	NT	NT	NT
22	R85A + A162L + F363I	15	1061	NT	NT	NT	NT	NT

23	R85A + A162C + F363M	19	5000	5000	5000	4310	2700	5000
24	R85A + A162C + F363I	16	5000	NT	NT	NT	NT	NT
25	A162C + V308 M+ F363M	45	3580	5000	420	2500	697	5000
26	A162C + V308L + F363M	53	2041	NT	NT	NT	NT	NT
27	R85C + F363M	28	2500	NT	NT	NT	NT	NT
28	R85H + F363M	30	622	NT	NT	NT	NT	NT
29	R85L + F363M	19	892	NT	NT	NT	NT	NT
30	R85T + F363M	24	1356	NT	NT	NT	NT	NT
31	R85V + F363M	18	875	NT	NT	NT	NT	NT
32	A162L + Q179G	39	5000	5000	630	4000	5000	5000

	⁺ F363M							
33	R85A	98	80	NT	NT	NT	NT	NT
34	F156A	85	28	NT	NT	NT	NT	NT
35	V160C	80	44	NT	NT	NT	NT	NT
36	A162C	76	75	NT	NT	NT	NT	NT
37	A162L	82	219	NT	NT	NT	NT	NT
38	V308 M	93	76	NT	NT	NT	NT	NT
39	F327V	22	81	NT	NT	NT	NT	NT
40	L330T	27	69	NT	NT	NT	NT	NT
41	I343T	18	365	NT	NT	NT	NT	NT

(NT: không được thử nghiệm)

Như được thể hiện trên bảng 10 và 11, được chứng minh là trong trường hợp biến thể của protein CyPPO, giá trị IC₅₀ của mỗi thuốc diệt cỏ được tăng lên đáng kể so với kiểu đại. Các kết quả này thể hiện là khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tăng lên bằng đột biến axit amin ở một số vị trí nhất định của protein PPO. Mặc dù dữ liệu theo sáng chế thể hiện rằng biến thể protein CyPPO giảm hoạt tính enzym so với kiểu đại, có thể do các điều kiện gấp nếp protein khác nhau, và/hoặc độ kỵ nước của PPO tái tổ hợp so với PPO tự nhiên. Trong khi PPO tự nhiên kỵ nước và định vị với màng của lục lạp ở cây trồng, PPO tái tổ hợp được đề xuất ở *E. coli* ưa nước chứa MBP là đối tác dung hợp. Vì vậy, khi biến thể PPO được lắp ráp đúng và biểu hiện với lục lạp ở cây trồng, hoạt tính enzym sẽ không bị ảnh hưởng mạnh.

Ví dụ 5. Tạo thành thể biến nạp *A. thaliana* sử dụng biến thể CyPPO và thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO

5-1. Cấu trúc vector thể biến nạp *A. thaliana* và tạo thành thể biến nạp *A. thaliana*

A. thaliana được biến nạp với vector hai thành phần có ORF của trình tự đánh dấu có thể chọn được, gen Bar (gen chống chịu glufosinat) và ORF của mỗi gen đột biến axit amin của CyPPO2, CyPPO4 hoặc CyPPO8. Cây trồng chuyển gen được kiểm tra

khả năng chống chịu ngang với glufosinat và thuốc diệt cỏ ức chế PPO. Gen bar cũng được sử dụng để kiểm tra xem liệu gen chuyển được di truyền ổn định trong khi tạo thành hay không. Gen khởi đầu NOS và gen kết thúc E9 được sử dụng để biểu hiện gen bar.

Để biểu hiện biến thể CyPPO2, biến thể CyPPO4, và biến thể CyPPO8, lần lượt ở cây trồng, gen khởi đầu CaMV35S và gen kết thúc NOS được sử dụng. Ngoài ra, để vận chuyển protein đến lục lạp, peptit vận chuyển (TP) của gen AtPPO1 (SEQ ID NO: 8) được chèn trước 5' của gen được chèn sử dụng enzym giới hạn XbaI và XhoI. Ngoài ra, để xác định protein được biểu hiện, thể hemagglutinin (HA) được dung hợp vào vùng đầu tận 3' sử dụng enzym giới hạn BamHI và SacI. Vùng peptit vận chuyển được chèn vào vector được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10, và trình tự thể HA đã chèn được thể hiện bởi SEQ ID NO: 11. Gen mã hóa của biến thể CyPPO2, biến thể CyPPO4, hoặc biến thể CyPPO8 được chèn giữa peptit vận chuyển và thể HA sử dụng enzym giới hạn XhoI và BamHI. Gen kết thúc NOS được chèn sau thể HA, do đó kết thúc phiên mã gen PPO. Biểu đồ của vector hai thành phần biến nạp cây trồng được thể hiện trên FIG. 31.

Mỗi vector đã tạo kết cấu được biến nạp vào tế bào khả biến *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 bằng phương pháp kết đông-xả đông. Để chuẩn bị tế bào khả biến *Agrobacterium* GV3101, chủng *Agrobacterium* GV3101 được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB trong điều kiện 30°C và 200 rpm trong 12 hrs. Dung dịch nuôi cấy được rót vào 200 ml môi trường LB, và sau đó được nuôi cấy trong điều kiện 30°C và 200 rpm trong 3~4 hrs, và được ly tâm ở 4°C trong 20 phút. Hạt tế bào được rửa bằng nước cất vô trùng, và sau đó được tạo huyền phù trong 20 ml môi trường LB. 200ul phân ước được làm đông lạnh nhanh bằng nitơ lỏng được bảo quản trong thiết bị đông lạnh sâu.

Mỗi *Agrobacterium* được biến nạp được nuôi cấy trong môi trường kháng sinh (thạch agar LB chứa spectinomycin) và được che chắn. Cụm nấm đã che chắn được nuôi cấy lỏng trong canh LB. Sau khi tế bào *Agrobacterium* được thu hoạch từ dung dịch nuôi cấy, nó được tạo huyền phù trong 5% (w/v) sucroza, 0,05% (v/v) dung dịch Silwet L-77 (công ty Momentive performance vật liệu) ở hệ số hấp thụ (OD₆₀₀) 0,8. Bằng phương pháp nhúng hoa, kiểu đại *A. thaliana* (kiểu sinh thái Col-0) được biến nạp, và sau đó hạt giống (T₀) được thu hoạch 1~2 tháng sau.

Gen bar ở vector hai thành phần được sử dụng để sàng lọc từng thể biến nạp. Các

hạt giống T₀ thu được được gieo vào môi trường 1/2 MS (2,25 g/L muối MS, 10 g/L sucroza, 7 g/L thạch Agar) bổ sung 25 μ M glufosinat, và cây trồng còn sống được chọn sau 7 ngày gieo, và được trồng lại vào đất và sinh trưởng, để thu được cây trồng T₁.

Để kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của cây trồng chuyển gen, cây trồng 4 tuần tuổi được phun đều 100ml dung dịch 1uM Tiafenacil (0,05% Silwet L-77) với mỗi khu vực 40 x 60 cm (0,24 m²). Trong khi *A. thaliana* kiểu dại (kiểu sinh thái Col-0) bị chết hoàn toàn trong 7 ngày sau khi xử lý, mỗi thể biến nạp thể hiện không hư hại khi xử lý thuốc diệt cỏ ức chế PPO.

Các hạt giống T₂ được gieo vào môi trường 1/2 MS (2,25 g/L muối MS, 10 g/L sucroza, 7 g/L thạch Agar) được bổ sung 25 μ M glufosinat, và sau 1 tuần, cây trồng sống sót được trồng lại vào đất.

A. thaliana PPO1 kiểu dại (AtPPO1 kiểu dại) được sử dụng là đối chứng âm có độ nhạy thuốc diệt cỏ ức chế PPO (số gia nhập GenBank AX084732 (trình tự nucleotit của gen được thể hiện bởi SEQ ID NO: 8, và trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 7)). AtPPO1 đột biến với sự thay thế axit amin Y426M (axit amin thứ 426, tyrosin được thế bằng methionin) và S305L (axit amin thứ 305, serin được thế bằng leuxin) trong trình tự axit amin của AtPPO1 kiểu dại được sử dụng là đối chứng dương (trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 9) (Li et al. Development of protoporphyrinogen oxidase as an efficient selection marker for agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of maize. Plant physiol. 2003 133:736-747).

Các biến thể CyPPO được sử dụng để tạo thành thể biến nạp *A. thaliana* được nêu ở bảng 12:

Bảng 12

Đột biến CyPPO2	Dòng số	Đột biến CyPPO4	Dòng số	Đột biến CyPPO8	Dòng số
Y373M	32	Y375M	14	F363M	22
	34		31		51
	38				52
	39			F363V	1

	40				18
Y373V	34			F363L	1
Y373I	23				33
	34			A162L	1
Y373L	23				5
	43			A162C + V308M + F363M	46
Y373C	40				48
V318M+Y373I	1				
	3				
V173S+A175C+Y373M	3				
	4				
	51				
	72				
	84				
A175C+V318M+Y373M	4				
	8				

5-2. Sự nảy mầm hạt giống

Khả năng chống chịu tiafenacil của *A. thaliana* được xác nhận sử dụng hạt giống T₂ sống sót dưới phun tiafenacil 1 μ M tại thế hệ T₁. Thể biến nạp được đưa thể đột biến Y373M của CyPPO2, thể đột biến Y375M của CyPPO4, hoặc thể đột biến F363M của CyPPO8 (thể biến nạp CyPPO2 Y373M, thể biến nạp CyPPO4 Y375M, và thể biến nạp CyPPO8 F363M, lần lượt). Khả năng chống chịu glufosinat của thể biến nạp được xác nhận bằng cách gieo hạt giống *A. thaliana* trong môi trường được bổ sung glufosinat (PPT 50 μ M).

Kết quả được thể hiện trên FIG. 32.

Các thể biến nạp số 32, số 34, và số 28 của CyPPO2 Y373M nảy mầm, thể biến nạp số 14 và số 31 của CyPPO4 Y375M, và số 22. Các thể biến nạp số 51 và số 52 của CyPPO8 F363M nảy mầm ngay cả trong môi trường 1/2 MS chứa nồng độ tiafenacil 1 μ M hoặc cao hơn. Ngoài ra, hạt giống *A. thaliana* kiểu dại (Col-0) dùng làm đối chứng âm không nảy mầm trong môi trường 1/2 MS chứa 70 nM tiafenacil, và thể biến nạp AtPPO1 đột biến (AtPPO1 SLYM) được sử dụng là đối chứng dương nảy mầm ngay cả trong môi trường 1/2 MS chứa tiafenacil 1 μ M.

5-3. Xác nhận tỷ lệ chia tách tính năng khả năng chống chịu trong hạt giống thể hệ T₂

Để xác định sự di truyền, tỷ lệ chia tách được nghiên cứu với hạt giống T₂. Các kết quả được thể hiện ở bảng 13 đến 15.

Bảng 13

Thể biến nạp CyPPO2 (T ₂)		
Đột biến	Dòng số	Tỷ lệ chia tách
Y373M	32	2,53:1
	34	3,21:1
	38	3,18:1
	39	3,17:1
Y373V	34	3,13:1
Y373I	23	2,70:1
	34	3,55:1
Y373L	5	2,7:1
	23	2,96:1
	43	3,3:1
Y373C	40	3,32:1
V318M+Y373I	1	2,95:1
	3	2,95:1

V173S+A175C+Y373M	3	3,27:1
	4	2,5:1
	72	3,08:1
	84	2,95:1
	51	3,32:1
A175C+V318M+Y373M	4	2,8:1
	8	2,57:1

Bảng 14

Thẻ biến nạp CyPPO4 (T ₂)		
Đột biến	Dòng số	Tỷ lệ chia tách
Y375M	14	2,53:1
	31	3:1

Bảng 15

CyPPO8 thẻ biến nạp (T ₂)		
Đột biến	Dòng số	Tỷ lệ chia tách
F363M	22	3,08:1
	51	3,54:1
	52	3,04:1
F363V	1	2,52:1
	18	2,57:1

F363L	1	2,54:1
	33	2,77:1
A162L	1	2,5:1
	5	3,5:1
A162C + V308M + F363M	46	2,6:1
	48	2,59:1

Như được thể hiện ở bảng 13, trong trường hợp thể biến nạp được chèn gen đột biến CyPPO2, dòng số 32, số 34, số 38, và số 39 của biến thể Y373M, dòng số 34 của biến thể Y373V, dòng số 23, và số 34 của biến thể Y373I, dòng số 23, và số 43 của biến thể Y373L, dòng số 40 của biến thể Y373C, dòng số 1 và số 3 của biến thể V318M+Y373I, dòng số 3, số 4, số 72, số 84, và số 51 của biến thể V173S+A175C+Y373M, và dòng số 4 và số 8 của biến thể A175C+V318M+Y373M cá thể có khoảng 3:1 khả năng chống chịu so với nhạy cảm, và do đó được chứng minh rằng bản sao đơn của gen chuyển được tích hợp vào hệ gen *A. thaliana* theo luật Mendel.

Như được thể hiện ở bảng 14, trong trường hợp thể biến nạp được chèn gen đột biến CyPPO4, dòng số 14 và số 31 của biến thể Y375M cá thể có khoảng 3:1 khả năng chống chịu so với nhạy cảm, và do đó được chứng minh rằng bản sao đơn của gen chuyển được tích hợp vào hệ gen *A. thaliana*.

Như được thể hiện ở bảng 15, trong trường hợp thể biến nạp được chèn gen đột biến CyPPO8, dòng số 22, số 51 và số 52 của biến thể F363M, dòng số 1 và số 18 của biến thể F363V, dòng số 1 và số 33 của biến thể F363L, dòng số 1 và số 5 của biến thể A162L, và dòng số 46 và số 48 của A162C+V308M+F363M cá thể có khoảng 3:1 khả năng chống chịu so với nhạy cảm, và do đó được chứng minh rằng bản sao đơn của gen chuyển được tích hợp vào hệ gen *A. thaliana*.

5-4. Điều tra biểu hiện protein CyPPO ở *A. thaliana* chống chịu thuốc diệt cỏ (T₂)

Biểu hiện của CyPPO2 Y373M, CyPPO4 Y375M hoặc CyPPO8 F363M ở mức protein được kiểm tra biểu hiện của gen đã đưa. Sau khi khoảng 100 mg lá thể biến nạp

A. thaliana T₂ được nghiền thành bột cùng nitor lỏng, protein được chiết bằng cách thêm chất đệm chiết protein (Tris-Cl 0,05 M độ pH 7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, Triton X-100 1%, DTT 1 mM). Quá trình thấm tách Western được tiến hành sử dụng protein đã chiết. Sau khi điện di, protein được chuyển đến màng PVDF (polyvinyliden diflorua), và sau đó quá trình thấm tách Western được tiến hành sử dụng kháng thể kháng HA (Santacruz) và kháng thể kháng actin (đối chứng tải, so sánh lượng protein thử nghiệm; Abcam).

Kết quả được thể hiện trên FIG. 33.

Mức biểu hiện protein PPO thể đột biến tương tự ở thể biến nạp CyPPO2 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M, trong khi CyPPO4 Y375M có mức biểu hiện biến thể PPO thấp.

Dòng thể biến nạp còn được xử lý bằng một thể hệ (thể hệ T₃), và được xác nhận rằng mỗi dòng thể biến nạp có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ (tham chiếu đến ví dụ 5-5). Điều này chỉ ra rằng sự biểu hiện của gen đã đưa được duy trì qua thể hệ và chúng được tạo khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ.

5-5. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của *A. thaliana* được biến nạp

Để chứng minh khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của gen mã hóa biến thể axit amin của CyPPO2, CyPPO4 và CyPPO8 ở cây trồng, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được thử nghiệm với thể hệ T₂ hoặc thể hệ T₃. Tất cả các thử nghiệm phun được thực hiện chỉ trước khi sàng, khoảng 4 tuần sau khi trồng lại. Một trăm mililit thuốc diệt cỏ với dung dịch (0,05% Silwet L-77) với mỗi khu vực 40 x 60 cm (0,24 m²) được phun.

Kết quả quan sát được ở ngày thứ 7 sau khi phun cho biến thể CyPPO2 Y373M, biến thể CyPPO4 Y375M, và biến thể CyPPO8 F363M được thể hiện trên FIG. 34 (kết quả của xử lý tiafenacil), FIG. 35 (kết quả của xử lý saflufenacil), và FIG. 36 (kết quả của xử lý fomesafen). Col-0 kiểu dại (đối chứng âm) bị chết, trong khi AtPPO1 SLYM (đối chứng dương) và nhóm thử nghiệm, dòng số 38, số 39 và số 34 của thể biến nạp CyPPO2 Y373M, và dòng số 22, số 51 và số 52 của thể biến nạp CyPPO8 F363M tất cả sinh trưởng liên tục trong tiafenacil 5 µM, saflufenacil 5 µM và fomesafen 5 µM. Dòng số 14 của thể biến nạp CyPPO4 Y375M sinh trưởng liên tục trong saflufenacil 5 µM và fomesafen 5 µM.

Tiafenacil 25 μM hoặc saflufenacil 75 μM được xử lý cho thể biến nạp T_3 của gen đột biến Y373C, Y373I, Y373L, Y373M và Y373V của CyPPO2. Và tiafenacil 25 μM hoặc saflufenacil 100 μM được phun cho thể biến nạp T_3 của gen đột biến F360L, F360V và A162L của CyPPO8.

Tiafenacil 5 μM được phun cho thể biến nạp T_2 của gen đột biến V318M+Y373I, V173S+A175C+Y373M và A175C+V318M+Y373M của CyPPO2. Tiafenacil 10 μM được phun cho thể hệ T_2 của thể biến nạp của gen đột biến A162C+V308M+F363M của CyPPO8.

Kết quả quan sát được ở ngày thứ 7 sau khi phun được thể hiện ở bảng 16 (Chỉ số tổn thương) và FIG. 37 (biến thể CyPPO2; thể hệ T_3 (phía trên, dưới)/thể hệ T_2 (ở giữa)) và FIG. 38 (biến thể CyPPO8; thể hệ T_3 (phía trên, ở giữa)/thể hệ T_2 (dưới)).

Bảng 16

Chỉ số tổn thương

	Dòng số	Tiafenacil	Saflufenacil
		5 μM	5 μM
Col-0 (kiểu đại)		5	5
CyPPO2		5	NT
Biến thể CyPPO2 (T_3)		25 μM	75 μM
Y373M	40-4	2,5	NT
Y373C	40-3	2	1,5
Y373I	23-2	0	1
	34-2	0	0,75
Y373L	23-9	1,5	1,6
	43-1	1,5	3
Y373V	34-10	2	2
Biến thể CyPPO2 (T_2)		5 μM	75 μM
V318M+Y373I	1	0	NT

	3	0	NT
V173S+A175C+Y373M	3	1,5	NT
	4	2	NT
	51	2	NT
	72	2	NT
	84	3	NT
A175C+V318M+Y373M	4	0	NT
	8	3	NT
CyPPO8		5	5
CyPPO8 biến thể (T ₃)		5 µM	75 µM
F363M	22	0	NT
	51	0	NT
	52	0	NT
		25 µM	100 µM
F363L	33-7	1,5	2,5
	1-3	2,5	1,5
F363V	1-7	0,5	0
	18-1	0,5	0
A162L	1-6	3,4	4
	5-4	3,4	3,8
	5-7	3,9	3,8
Biến thể CyPPO8 (T ₂)		10µM	100 µM
A162C + V308M + F363M	46	1	NT
	48	1	NT
CyPPO4 biến thể		5µM	5µM

Y375M	14	4	2
-------	----	---	---

NT: Không được thử nghiệm

Chỉ số tổn thương của bảng 16 được đánh giá theo tiêu chí của bảng 17 sau đây (nó được áp dụng bằng với chỉ số tổn thương được đề xuất trong ngữ cảnh):

Bảng 17

Chỉ số tổn thương	Triệu chứng
0	Không hư hại
1	Lá khô rụng
2	Trên 20% và ít hơn 30% cây trồng bị cháy sém
2,5	Trên 30% và ít hơn 50% cây trồng bị cháy sém
3	Trên 50% và ít hơn 70% cây trồng bị cháy sém
4	Trên 70% cây trồng bị cháy sém
5	Toàn bộ cây khô và chết

Như được thể hiện ở bảng 16 và FIG. 37, tất cả thể biến nạp của biến thể CyPPO2 lần lượt sinh trưởng liên tục không chỉ ở tiafenacil 5 μ M mà còn 25 μ M.

Như được thể hiện ở bảng 16 và FIG. 38, thể biến nạp của mỗi biến thể CyPPO8 sinh trưởng liên tục không chỉ ở tiafenacil 10 μ M mà còn 25 μ M, và sinh trưởng liên tục ở saflufenacil 100 μ M.

Ngoài ra, mức khả năng chống chịu của thể biến nạp (T_3) trong đó CyPPO2 Y373I và CyPPO8 F363V được đưa lần lượt được xác nhận trong mỗi 50 μ M thuốc diệt cỏ (flumioxazin, sulfentrazone, tiafenacil hoặc saflufenacil). AtPPO1 SLYM được sử dụng làm nhóm đối chứng khả năng chống chịu (đối chứng dương). Tiafenacil, saflufenacil, flumioxazin, hoặc sulfentrazone được xử lý lần lượt ở nồng độ 50 μ M, và sau 7 ngày, chỉ số tổn thương được đánh giá. Kết quả được thể hiện trên FIG. 45 và bảng

18. Để tham khảo, khối lượng phân tử (MW) của tiafenacil là 511,87, và khối lượng phân tử của saflufenacil là 500,85, và khối lượng phân tử của flumioxazin là 354,34, và khối lượng phân tử của sulfentrazone là 387,18. Mỗi thuốc diệt cỏ ở nồng độ 50 μM đều được phun với 100ml trên khu vực 40 x 60 cm (0,24 m²). Các liều lượng xử lý đã chuyển hóa tương ứng với 106,7 g ai/ha tiafenacil, 104,4 g ai/ha saflufenacil, 73,8 g ai/ha flumioxazin, và 80,7 g ai/ha sulfentrazone, lần lượt.

Bảng 18

Chỉ số tồn thương

	AtPPO1 SLYM	CyPPO8 F363V	CyPPO2 Y373I
Tiafenacil	4	2	2
Saflufenacil	0-1	0-1	0-1
Flumioxazin	4-5	2	3
Sulfentrazone	0-1	0-1	0-1

Như được thể hiện trên FIG. 45 và bảng 18, khả năng chống chịu của thể biến nạp gen đột biến tương tự hoặc cao hơn so với AtPPO1 SLYM mà đã được biết có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ.

Trong khi *A. thaliana* kiểu dại chết sau khi xử lý tiafenacil 0,8 μM , thể biến nạp thể đột biến PPO sinh trưởng liên tục ở xử lý tiafenacil 5 μM , 10 μM , hoặc 25 μM .

Từ kết quả này, biến thể CyPPO dự kiến sẽ cung cấp các khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO khác nhau với các cây trồng khác cũng như *A. thaliana*.

5-6. Xác nhận độ ổn định gen chuyển trong thể hệ cây chuyển

Thử nghiệm này để xác nhận rằng gen được đưa ở *A. thaliana* được di truyền ổn định và được biểu hiện thậm chí nếu thể hệ phát triển.

Các thể biến nạp thể đột biến CyPPO2 Y373I và thể đột biến CyPPO8 F363V được phát triển đến thế hệ T₄, hoặc T₅ như sau; dòng T₃ 23-2, 23-7, 34-2 của CyPPO2 Y373I và 1-7, 18-1, 18-7 của CyPPO8 F363V. Khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được duy trì qua thế hệ T₃ đến T₅ của mỗi dòng thể hiện độ ổn định của gen chuyển trong thể

hệ.

Cụ thể là, tiafenacil 15 μ M hoặc saflufenacil 150 μ M được xử lý cho dòng T₄ hoặc T₅, và 7 ngày sau khi xử lý thuốc diệt cỏ, mức hư hại được đánh giá. Kết quả được thể hiện trên FIG. 46 (dòng T₄) và FIG. 47 (dòng T₅).

Ngoài ra, quá trình thâm tách Western được tiến hành để xác nhận sự biểu hiện protein. Protein được chiết từ thể biến nạp. Sau khi làm sạch cây giống sử dụng nito lỏng, chất đệm chiết protein (M Tris-Cl 0,05 độ pH 7,5, NaCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, Triton X-1001%, DTT 1 mM) được bổ sung và tổng protein được chiết. Protein đã chiết được chuyển đến màng PVDF sau khi điện di, quá trình thâm tách Western được tiến hành sử dụng kháng thể kháng HA (Santacruz). Các protein được biểu hiện ở thể biến nạp được phát hiện. Kết quả được thể hiện trên FIG. 48 (dòng T₄) và FIG. 49 (dòng T₅).

Như được thể hiện trên FIG. 46 đến FIG. 49, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của tất cả thể hệ T₄ và T₅ được duy trì, và biểu hiện protein PPO cũng được xác nhận. Cụ thể là, trong khi Col-0 (đối chứng âm) hoàn toàn chết khi tiafenacil 15 μ M hoặc 150 μ M saflufenacil được xử lý, thể biến nạp T₄ và T₅ được duy trì không có tổn thương (Chỉ số tổn thương 0). Để tham khảo, khi tiafenacil 25 μ M hoặc saflufenacil 75 μ M được xử lý ở thể hệ T₃, mức chỉ số tổn thương là 0~1.

Ví dụ 6. Tạo thành thể biến nạp cây lúa sử dụng biến thể CyPPO và thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO

6-1. Cấu trúc của vector biến nạp cây lúa và tạo thành thể biến nạp cây lúa

Vector hai thành phần có ORF của gen Bar (gen chống chịu glufosinat) và ORF của mỗi gen đột biến axit amin của CyPPO2 hoặc CyPPO8 được tạo kết cấu và được sử dụng để biến nạp cây lúa. Mỗi gen được tách dòng ở vector pCambia3301 (tham chiếu đến FIG. 39). Gen khởi đầu CaMV 35S để biểu hiện gen Bar và gen kết thúc 35S để chấm dứt phiên mã được sử dụng.

Để biểu hiện gen đột biến của CyPPO2 hoặc CyPPO8 ở cây trồng, gen khởi đầu ubiquitin của cây ngô và gen kết thúc NOS được sử dụng. Ngoài ra, peptit vận chuyển (TP) của AtPPO1 được dung hợp ở vùng đầu tận N của thể đột biến CyPPO2 hoặc CyPPO8. Mỗi vector đã tạo kết cấu được biến nạp vào tế bào khả biến *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Takara) bằng phương pháp sốc điện.

Agrobacterium được biến nạp được sử dụng để biến nạp cây lúa Dongjin (giống kiều dại). Sau khi loại bỏ trấu hạt giống của cây lúa Dongjin, khử trùng, và nuôi cấy tối trong môi trường N6D ở 32°C trong 5 ngày, hạt giống cây lúa được trộn với dung dịch *Agrobacterium* được biến nạp, và sau đó được trồng lại trên môi trường 2N6-AS100. Nó được ủ ở 28°C trong 1 ngày ở bóng tối, và sau đó được ủ ở 23,5°C trong 4 ngày ở bóng tối. Hạt giống được ủ trên môi trường N6D cf500 ppt4 được bổ sung nồng độ phosphinothricin thích hợp (Duchefa) ở 28°C trong 10 ngày dưới ánh sáng, và thể sản được biến nạp được chọn trong hạt giống bị nhiễm. Thể sản được chọn được chuyển vào môi trường REIII cf500 ppt4 được bổ sung nồng độ phosphinothricin thích hợp (Duchefa), do đó tạo ra cây trồng.

Chế phẩm của môi trường đã sử dụng được nêu ở bảng 19:

Bảng 19

Tên môi trường	Thành phần	Sử dụng
N6D	Bột N6	4 g
	Sucroza	30 g
	L-Prolin	2,878 g
	Axit casamino	0,3 g
	Myo-Inositol	0,1 g
	2,4-Diclophenoxy (hòa tan trong etanol)	2 mg
	Phytigel	4 g
	Nước cất lên đến	1L (độ pH 5,8)
2N6-AS100	Bột N6	4 g
	Sucroza	30 g
	D-glucosa (Monohydrat)	10 g
	Axit casamino	0,3 g
	2,4-Diclophenoxy (hòa tan trong etanol)	2 mg
	Phytigel	4 g

	Axetosyringon (20 mg/ml, hòa tan trong DMSO)	1 ml
	Nước cất lên đến	1L (độ pH 5,2)
N6D cf500 ppt4	Bột N6	4 g
	Sucroza	30 g
	L-prolin	2,878 g
	Axit casamino	0,3 g
	Myo-inositol	0,1 g
	2,4-Diclophenoxy (2 mg/ml trong etanol)	1 ml
	Phytigel	4 g
	Xefotaxim natri	500 mg
	Nước cất lên đến	1L (độ pH 5,8)
REIII cf500 ppt4	Bột vitamin MS	4,41 g
	Sucroza	30 g
	Sorbitol	30 g
	Axit casamino	2 g
	NAA (1mg/ml)	20 µl
	Kinetin	2 mg
	Myo-inositol	0,1 g
	Phytigel	4 g
	Xefotaxim natri	500 mg
	Nước cất lên đến	1L (độ pH 5,8)

6-2. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO của cây lúa được biến nạp

Để kiểm tra mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thể biến nạp của gen đột biến CyPPO2 và CyPPO8 ở cây một lá mầm, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được

thử nghiệm ở cây trồng thế hệ T_0 của cây lúa Dongjin trong đó mỗi gen được biến nạp.

Sau khi làm đâm chồi cây lúa 5 tuần tuổi của thế hệ T_0 của thể biến nạp CyPPO2 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M, chúng được phép sinh trưởng, và tiafenacil hoặc saflufenacil được xử lý, lần lượt. Hai trăm mililit tiafenacil 200 μ M (tương ứng với 853 g ai/ha) hoặc saflufenacil 500 μ M (tương ứng với 2085 g ai/ha) được xử lý ở khu vực 40 X 60 cm. Để tham khảo, liều lượng tiafenacil xử lý đề nghị cho đối chứng cỏ dại là khoảng 150 g ai/ha, và liều lượng saflufenacil xử lý đề nghị cho đối chứng cỏ dại là dưới 145 g ai/ha.

Thể biến nạp T_2 của CyPPO2 Y373M và CyPPO8 F363M được sử dụng để xử lý thuốc diệt cỏ ở ngày thứ 47 sau khi gieo hạt. Một trăm mililit tiafenacil 200 μ M (tương ứng với 420 g ai/ha) và saflufenacil 400 μ M (tương ứng với 840 g ai/ha) được phun lần lượt ở khu vực 40 X 60 cm. Kết quả quan sát được ở ngày thứ 7 sau khi phun được thể hiện trên FIG. 40 (kết quả thể hiện cây trồng thế hệ T_0 của thể biến nạp CyPPO2 Y373M dòng số 1 và số 3 và thể biến nạp CyPPO8 F363M dòng số 2 và số 3 sau khi xử lý tiafenacil hoặc saflufenacil) và FIG. 41 (thể hiện cây trồng thế hệ T_2 của thể biến nạp CyPPO2 Y373M dòng #3 và thể biến nạp CyPPO8 F363M dòng #3 sau khi xử lý tiafenacil hoặc saflufenacil), lần lượt. “Không GM” trên FIG. 40 chỉ ra cây lúa Dongjin kiểu dại không được biến nạp, và được sử dụng làm đối chứng âm.

Như được thể hiện trên FIG. 40 và FIG. 41, hư hại nghiêm trọng ở đối chứng âm, cây lúa Dongjin kiểu dại, sau khi xử lý tiafenacil hoặc saflufenacil, nhưng không hư hại hoặc ít quan sát được ở cây trồng thế hệ T_0 của thể biến nạp CyPPO2 Y373M (được thể hiện bởi “CyPPO2YM”) dòng số 1 và số 3 và cây trồng thế hệ T_2 của thể biến nạp CyPPO2 Y373M #3-1. Không hư hại nào quan sát được ở cây trồng thế hệ T_0 của thể biến nạp CyPPO8 F363M (được thể hiện bởi “CyPPO8FM”) số #1 và #3 và cây trồng thế hệ T_2 của thể biến nạp CyPPO8 F363M #3-1 so với cây lúa Dongjin kiểu dại sau khi xử lý tiafenacil hoặc saflufenacil.

Tất cả cây lúa thể biến nạp CyPPO2 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M có khả năng chống chịu sau khi xử lý tiafenacil hoặc saflufenacil nồng độ cao hơn nồng độ đề nghị cho đối chứng cỏ dại. Điều này thể hiện rằng gen được đưa vào cây lúa được di truyền và biểu hiện ổn định, thể hiện khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO qua các thế hệ.

6-3. Kiểm tra biểu hiện protein ở thể biến nạp cây lúa

Để xác nhận rằng protein đột biến (CyPPO2 Y373M hoặc CyPPO8 F363M) được biểu hiện ở thể biến nạp CyPPO2 Y373M và thể biến nạp CyPPO8 F363M, protein được chiết ở lá từ mỗi dòng thể biến nạp, và quá trình thấm tách Western được tiến hành.

Đối với điều này, 5 ml/g mô chất đệm chiết (Tris-Cl 50 mM, độ pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-400,5%) và chất ức chế proteaza (Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution, GenDepot) được bổ sung vào mô lá của mỗi thể biến nạp. Protein được chiết được nạp vào SDS-PAGE gel, và chuyển cho màng PVDF. Màng được ủ bằng kháng thể sơ cấp cụ thể ở peptit CyPPO2 hoặc CyPPO8 (GenScript) ở tỷ lệ 1:1000. Protein được phát hiện bằng kháng thể bậc hai tiếp hợp HRP sử dụng thuốc thử ECL và Luminograph (Atto).

Ảnh thu được được thể hiện trên FIG. 42 (biểu hiện CyPPO2 Y373M) và FIG. 43 (CyPPO8 F363M). Protein CyPPO được phát hiện ở thể biến nạp CyPPO2 Y373M dòng #1 và #3 và thể biến nạp CyPPO8 F363M dòng #2 và #3.

6-4. Phân tích số bản sao của gen được đưa ở cây lúa được biến nạp

ADN hệ gen được chiết từ mô lá của thể biến nạp CyPPO8 F363M để phân tích số bản sao của gen chuyển.

ADN hệ gen được chiết như sau. Sau khi nghiền mô lá của cây lúa được biến nạp sử dụng chày và cối trong nitơ lỏng, 5 ml/g mô của chất đệm phân lập ADN (CTAB 2% (w/v), NaCl 1,5 M, EDTA 25 mM, beta-mercaptoetanol 0,2% (v/v), Tris-Cl 100 mM (độ pH 8,0)) được bổ sung và tạo xoáy. Sau khi gia nhiệt ở 60°C hơn 1 giờ, 1 thể tích clorofom:rượu isoamyl (24:1) được bổ sung và trộn với đảo ngược. Sau khi ly tâm ở điều kiện 7000 xg trong 10 phút ở 4°C, dịch nổi được chuyển sang ống mới, và 2,5 thể tích etanol được trộn. Sau khi ly tâm ở 5000 xg trong 5 phút ở 4°C, dịch nổi bị loại bỏ và hạt được hòa tan trong chất đệm TE (LPSS). Sau khi thêm 20 µg/ml RNase A (Bioneer), nó được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau khi thêm 1 thể tích phenol:clorofom (1:1), nó được trộn và ly tâm ở 10000 xg trong 10 phút ở 4°C. Dịch nổi được chuyển sang ống mới, và sau đó 1 thể tích clorofom:rượu isoamyl (24:1) được bổ sung và trộn. Sau khi ly tâm ở 10000 xg trong 10 phút ở 4°C, dịch nổi được chuyển sang ống mới, và 0,1 thể tích NaOAc (pH 5,2) và 2 thể tích etanol được bổ sung và trộn. Sau đó, nó

được ly tâm ở 5000 xg trong 5 phút ở 4°C, và hạt được rửa bằng etanol 70%. Sau khi sấy không khí, ADN hệ gen được hòa tan với lượng chất đệm TE thích hợp.

10~40 µg ADN được chiết được tiêu qua đêm sử dụng EcoRI (Enzymomics).

Sau đó, sau khi điện di Agarosa gel 0,8% (w/v) (50 V), gel được xử lý như sau:

1) khử purin: HCl 0,25 N, lắc 15 phút

2) biến tính: NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M, lắc 30 phút

3) trung hòa: Tris 0,5 M (độ pH 7,5), NaCl 1,5 M, lắc 20 phút

Sau đó, đoạn DNA được chuyển đến màng nitrocellulose (GE healthcare) sử dụng phương pháp chuyển mao quản, liên kết ngang được thực hiện sử dụng UV Crosslinker (UVC-508; ULTRA LUM Inc.).

Quá trình lai được thực hiện bằng phương pháp sau đây: Màng nitrocellulose được nhúng vào dung dịch Easyhybridization (Roche), và được ủ ở 42°C trong 3 hrs. Sau đó, dung dịch bị loại bỏ, thế bằng dung dịch DIG Easyhybridization mới, và được ủ qua đêm ở 42°C.

Đoạn dò (đoạn dò CyPPO8-M được gắn nhãn DIG) được dán nhãn bằng phản ứng PCR như sau:

Vật liệu

Mẫu (ADN plasmid CyPPO8)	0,5µl
Chất đệm 10X	3µl
DIG-dNTP	2µl
đoạn mồi xuôi (10µM)	3µl
đoạn mồi ngược (10µM)	3µl
DDW	18µl
polymeraza e-Taq (Solgent Inc.)	0,5µl
tổng	30µl

Bảng 20

Điều kiện để phản ứng PCR

94°C	3 min	35 chu kỳ
94°C	30 sec	
58°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

Trình tự cho đoạn mồi

Đoạn mồi xuôi cho đoạn dò CyPPO8 F363M:
GCGTTAACGGGTGCATTAGGC (SEQ ID NO: 158)

Đoạn mồi ngược cho đoạn dò CyPPO8 F363M:
TGGAAAGAGTGTGAACTCC (SEQ ID NO: 159)

Sau khi sản phẩm PCR được điện di trong agarose gel, dải đoạn dò có nhãn được chiết.

Sau khi lai với đoạn dò có nhãn, màng được rửa trong chất đệm rửa tính nghiêm ngặt thấp (2X SSC, 0,1% SDS) tiếp theo là chất đệm rửa tính nghiêm ngặt cao (0,5X SSC, 0,1% SDS). Tín hiệu tách Southern được phát hiện như sau:

- 1) lắc trong 30 phút sau khi thêm chất đệm phong bế (Roche) vào màng
- 2) lắc trong 30 phút sau khi thêm kháng thể DIG (anti-digoxigenin-AP Fab fragments, Roche)
- 3) lắc trong 15 phút trong chất đệm rửa (Roche)
- 4) lắc trong 3 phút sau khi thêm chất đệm phát hiện (Roche)
- 5) Sau khi sử dụng CDP-Star, sẵn để sử dụng (Roche) trên màng, phát triển vết trên phim tia x.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 44. CyPPO8 F363M dòng #3 thể hiện một dải, chỉ ra bản sao đơn của gen được chèn ở hệ gen cây lúa.

Ví dụ 7. Tạo thành thể biến nạp cây đậu tương sử dụng biến thể CyPPO và thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO

7-1. Tạo thành thể biến nạp cây đậu tương

Vector để biến nạp cây đậu tương với gen CyPPO2 Y373M hoặc CyPPO8 F363M được tạo kết cấu.

Trình tự của peptit vận chuyển của PPO1 *A. thaliana* được dung hợp vào vùng 5'

của CyPPO2 Y373M hoặc CyPPO8 F363M (tham chiếu đến FIG. 31), và gen đã dung hợp được mở rộng và phân lập cho cấu trúc vector.

Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng 50 μ l) được chuẩn bị bằng cách trộn 1 μ l mẫu (vector mà được sử dụng để biến nạp *A. thaliana*), 5 μ l chất đệm 10X, 1 μ l hỗn hợp dNTP (mỗi 10 mM), 1 μ l đoạn mỗi TOPO-cTP_F (10 μ M), 1 μ l đoạn mỗi TOPO-CyPPO2_R hoặc TOPO-CyPPO8_R (10 μ M), 40 μ l DDW, và 1 μ l Pfu-X (Solgent, 2,5 unit/ μ l), và việc mở rộng được thực hiện dưới điều kiện 1 chu kỳ 94°C trong 4 phút, và 25 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây và 72°C trong 1,5 phút, và 1 chu kỳ 72°C trong 5 phút.

Đoạn mỗi sử dụng được tóm tắt trong bảng 21:

Bảng 21

Đoạn mỗi	Trình tự
TOPO-cTP_F	CAC CAT GGA GTT ATC TCT TC (SEQ ID NO: 160)
TOPO-CyPPO2_R	TCA GAT CGA TCG AGT ATC TG (SEQ ID NO: 161)
TOPO-CyPPO8_R	TTA ACC CAA ATA ATC TAA CA (SEQ ID NO: 162)

Mỗi sản phẩm được mở rộng bị thất vào vector pENTR-TOPO (Invitrogen, tham chiếu đến FIG. 50) sử dụng bộ dụng cụ tách dòng pENTR Directional TOPO (Invitrogen), và sản phẩm thất được biến nạp vào tế bào khả biến DH5 alpha (Invitrogen).

Gen đã tách dòng trong vector pENTR-TOPO được chuyển đến vector hai thành phần pB2GW7.0 để biến nạp cây trồng. Bộ kit hỗn hợp enzym Gateway LR Clonase II (Invitrogen) được sử dụng cho cấu trúc vector pB2GW7.0. Sau khi trộn vector pENTR/D-TOPO trong đó gen CyPPO2YM hoặc CyPPO8FM được chèn, chất đệm TE, và hỗn hợp enzym LR Clonase II, hỗn hợp được ủ ở 25°C trong 1 hr. Sau khi dung dịch Proteinase K (Invitrogen) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, nó được ủ ở 37°C trong 10 phút, và nó được biến nạp vào tế bào khả biến DH5 alpha.

Agrobacterium tumefaciens EHA105 (Hood et al., New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). Trans Res. 1993 2:208-218) được biến nạp điện với cấu trúc vector hai thành phần ở trên. Cây đậu tương ‘Kwangan’ được sử dụng để biến nạp. Sau khi loại bỏ vỏ hạt giống từ hạt giống cây đậu tương, trụ dưới lá

mầm được cắt và tạo vết xước 7-8 lần bằng dao mổ (lưỡi #11). Khoảng 50 miếng mô cấy được trộn với *Agrobacterium* được biến nạp EHA105, và hỗn hợp được nghiền bằng sóng âm trong 20 giây và sau đó được ủ trong 30 phút để tiêu. Nó được đặt trên môi trường CCM (môi trường đồng trồng trọt; Gamborg B50,32 g/L, MES 4,26 g/L, sucroza 30 g/L, thạch agar 0,7%). Sau đó, nó được đồng nuôi cấy trong buồng sinh trưởng (25°C, 18 hr ánh sáng/ 6 hr bóng tối) trong 5 ngày.

Sau đó nó được rửa trong 10 phút trong 1/2 SIM lỏng (môi trường cảm ứng chồi; muối B53,2 g/L, BA 1,67 mg/L, MES 3 mM, thạch agar 0,8% (w/v), sucroza 3% (w/v), Xefotaxim 250 mg/L, vancomycin 50 mg/L, ticarxillin 100 mg/L, độ pH 5,6) và được đặt trên SIM không có các chất kháng sinh và được nuôi cấy trong buồng sinh trưởng (25°C, 18 hr ánh sáng/ 6 hr bóng tối) trong 2 tuần.

Mô cấy do chồi tạo ra được trồng lại trên SIM-1 (môi trường SIM được bổ sung DL-phosphinothricin 10 mg/L, độ pH 5,6). Các chồi hóa nâu được trồng lại trên SEM (môi trường kéo dài chồi; muối MS 4,4 g/L, MES 3 mM, GA30,5 mg/L, asparagin 50 mg/L, axit pyroglutamic 100 mg/L, IAA 0,1 mg/L, zeatin 1 mg/L, sucroza 3% (w/v), thạch agar 0,8% (w/v), Xefotaxim 250 mg/L, vancomycin 50 mg/L, ticarxillin 100 mg/L, DL-phosphinothricin 5 mg/L, độ pH 5,6). Các chồi kéo dài chiều cao hơn 4 cm được chuyển vào RIM (môi trường cảm ứng rễ; muối MS 4,4 g/L, MES 3 mM, sucroza 3%, thạch agar 0,8%, Xefotaxim 50 mg/L, vancomycin 50 mg/L, ticarxillin 50 mg/L, asparagin 25 mg/L, axit pyroglutamic 25 mg/L, độ pH 5,6).

Khi rễ phát triển đầy đủ, cây trồng được di chuyển lên đất (Bioplug No. 2, Farmhannong) được trộn với chất khoáng theo 2:1 (v/v). Sau 10 ngày, lá được sơn bằng DL-phosphinothricin 100 mg/L.

7-2. Phân tích gen được đưa ở thể biến nạp cây đậu tương

Để phân tích số bản sao của gen được đưa ở cây đậu tương T₀ được biến nạp CyPPO2 Y373M (dòng số 12, 14, 16, 24, 25, 27, 28, 34, và 41) và cây đậu tương T₁ được biến nạp CyPPO8 F363M (dòng số 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 36, và 44), ADN hệ gen được chiết bằng 250 mg mô lá của mỗi cây trồng được biến nạp tham chiếu đến ví dụ 6-4.

10~40 µg ADN hệ gen được tiêu với EcoRI (Enzynomics) qua đêm, và thẩm tách

southern được thực hiện sau phương pháp ở ví dụ 6-4.

Đoạn dò ADN Bar để lai được chuẩn bị bằng cách dán nhãn với DIG (Digoxigenin)-dNTP bằng phản ứng PCR. Hỗn hợp phản ứng PCR (tổng 50 µl) được chuẩn bị bằng cách trộn 0,5 µl mẫu (vectơ mà được sử dụng để biến nạp cây đậu tương), 5 µl chất đệm 10X, 10 µl hỗn hợp DIG-dNTP (dATP, dCTP, dGTP, lần lượt, 0,5 mM, dTTP 0,32 mM, DIG-11-dUTP 0,18 mM), 0,5 µl đoạn mồi xuôi (100 µM), 0,5 µl đoạn mồi ngược (100 µM), 33 µl DDW, và 0,5 µl e-Taq (Solgent, 2,5 unit/µl), và việc mở rộng được thực hiện dưới điều kiện 1 chu kỳ 94°C trong 4 phút, và 35 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 56°C trong 30 giây và 72°C trong 30 giây, và 1 chu kỳ 72°C trong 5 phút.

Đoạn mồi dò Bar :

Đoạn mồi xuôi cho đoạn dò bar: 5'- TTC CGT ACC GAG CCG CAG GA -3'
(SEQ ID NO: 163)

Đoạn mồi ngược cho đoạn dò bar: 5' - CGT TGG GCA GCC CGA TGA CA -3'
(SEQ ID NO: 164)

Để so sánh, ADN hệ gen của cây đậu tương Kwangan không được biến nạp (WT) được sử dụng làm đối chứng âm.

Kết quả được thể hiện trên FIG. 51. Số dải được thể hiện trên phim ở FIG. 51 có nghĩa là số gen được chèn. Trong trường hợp cây đậu tương Kwangan không được biến nạp (WT), không dải nào được phát hiện, và được chứng minh rằng một bản sao của gen CyPPO được tích hợp vào hệ gen của cây đậu tương Kwangan ở thể biến nạp CyPPO2 Y373M dòng số 14, 25, 34, và 41 và ở thể biến nạp CyPPO8 F363M dòng số 3, 5, 7, 11, 14, và 17.

Sau đây, sử dụng bản sao đơn được chèn dòng thể biến nạp, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được đánh giá và biểu hiện protein CyPPO được thử nghiệm.

7-3. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây đậu tương được biến nạp

Để kiểm tra mức khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây đậu tương được biến nạp CyPPO2 Y373M hoặc CyPPO8 F363M, thuốc diệt cỏ được áp dụng cho thể biến nạp cây đậu tương (thể hệ T₂).

Hai mươi micromol tiafenacil (tương ứng với 42 g ai/ha) hoặc 150 μ M (tương ứng với 315 g ai/ha) hoặc 300 μ M (tương ứng với 630 g ai/ha) saflufenacil được phun lần lượt cho cây đậu tương của giai đoạn V2~3. 100 ml thuốc diệt cỏ của nồng độ ở trên đều được phun trên khu vực 40 X 60 cm, và sau 5 ngày, khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được đánh giá. Cây đậu tương không được biến nạp (được thể hiện bởi cây đậu tương Kwangan) được sử dụng làm đối chứng.

FIG. 52 thể hiện kết quả. Trong khi cây đậu tương không được biến nạp Kwangan chết ở mỗi lần xử lý thuốc diệt cỏ với chỉ số tổn thương 9, chỉ số tổn thương của thể biến nạp CyPPO2 Y373M hoặc CyPPO8 F363M là 1~3 khi được xử lý bằng 20 μ M tiafenacil. Và chỉ số tổn thương của thể biến nạp CyPPO2 Y373M là 0 khi được xử lý bằng 150 μ M saflufenacil và của thể biến nạp CyPPO8 F363M là 0 khi được xử lý bằng 300 μ M saflufenacil. Chỉ số tổn thương được xác định bằng sau đây chỉ tiêu:

Bảng 22

Chỉ số tổn thương	Mô tả hư hại bởi xử lý thuốc diệt cỏ
0	Không hư hại
1	Mức rất yếu, phần lá rất nhỏ bị hư hại hoặc bệnh gỉ sắt quan sát được.
2	Triệu chứng hư hại yếu với bệnh gỉ sắt nghiêm trọng nhỏ, không tác động trên toàn bộ điều kiện sinh trưởng
3	Không tác động lên lá mầm và điểm sinh trưởng, hư hại nghiêm trọng nhỏ quan sát được ở mô lá bậc hai
4	Toàn bộ hình dạng cây bị thay đổi nhỏ. Không có tác động lên thân, nhưng bệnh gỉ sắt và hoại tử quan sát được ở điểm sinh trưởng và mô lá bậc hai. Được coi là có khả năng sinh trưởng lại trong một tuần.
5	Toàn bộ hình dạng cây chắc chắn bị thay đổi. Bệnh gỉ sắt và hoại tử quan sát được ở nhiều lá và điểm sinh trưởng. Điểm sinh trưởng sơ cấp không bị hư hại, và thân có màu xanh. Được coi là có khả năng sinh trưởng lại trong một tuần.
6	Hư hại nặng với sự sinh trưởng của lá nhỏ mới sinh trưởng quan sát được. Được coi là cây trồng có thể sống sót bằng cách sinh trưởng ở điểm sinh trưởng khác nhau. Bệnh gỉ sắt và hoại tử quan sát được ở nhiều lá, và thân có màu xanh. Được coi là có khả năng sinh trưởng lại, nhưng triệu chứng

	hư hại quan sát được nghiêm trọng.
7	Bệnh gỉ sắt có ở phần lớn điểm sinh trưởng. Có khả năng sinh trưởng lại ở một trong số điểm sinh trưởng, và hai lá một phần có màu xanh. Bệnh gỉ sắt, hoại tử, và màu xanh một phần. Phần còn lại của cây trồng bao gồm thân có hoại tử.
8	Tất cả điểm sinh trưởng bị hoại tử, và cây trồng có khả năng chết. Một lá một phần có màu xanh.
9	Cây trồng bị hoại tử.

Kết quả thể hiện rằng trong khi cây đậu tương Kwangan kiểu dại chết với xử lý thuốc diệt cỏ ở mỗi nồng độ, thể biến nạp có hư hại yếu với xử lý tiafenacil và hầu như không có hư hại với xử lý saflufenacil. Làm tham khảo, giá trị IC_{50} cho tiafenacil hoặc saflufenacil của CyPPO2 Y373M là 250 nM hoặc 5000 nM, lần lượt, và giá trị IC_{50} cho tiafenacil hoặc saflufenacil của CyPPO8 F363M là 183 nM hoặc 5000 nM, lần lượt (bảng 10 đến 11).

7-4. Kiểm tra biểu hiện protein ở cây đậu tương được biến nạp

Biểu hiện của protein CyPPO2 Y373M hoặc protein CyPPO8 F363M ở cây trồng được biến nạp được kiểm tra.

Để kiểm tra biểu hiện protein, tổng protein được chiết ở mỗi thể biến nạp (T_1) và phân tích tách chiết western được tiến hành. Sau khi cắt xén mô lá của mỗi thể biến nạp với nitor lỏng, chất đệm chiết protein (0,8% SDS, 4% glyxerol, 2% beta-mercaptoetanol, 0,0008% bromophenol xanh, 0,125M Tris-Cl, độ pH 7,4) được bổ sung và tổng protein được chiết.

Protein được chiết được điện di trong SDS-PAGE gel và được chuyển sang màng PVDF. Màng được đánh dấu với kháng thể cụ thể ở mỗi protein được chèn (kháng thể cụ thể ở CyPPO2 cho thể biến nạp CyPPO2 Y373M, kháng thể cụ thể ở CyPPO8 cho thể biến nạp CyPPO8 F363M; GenScript).

Kết quả được chứng minh là protein CyPPO2 Y373M hoặc protein CyPPO8 F363M được biểu hiện ở tất cả các cá thể thể biến nạp (FIG 53). Nó thể hiện là khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thể biến nạp được tạo ra bởi biểu hiện của protein CyPPO2 Y373M hoặc protein CyPPO8 F363M.

Ví dụ 8. Tạo thành thể biến nạp hạt cải sử dụng biến thể CyPPO và thử nghiệm khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế PPO

8-1. Tạo thành thể biến nạp hạt cải

Vectơ, trong đó gen CyPPO8 F363M được chèn, đã tạo kết cấu ở ví dụ 5-1 được sử dụng để tạo thành thể biến nạp hạt cải.

Các hạt giống của hạt cải được khử trùng với 70% (v/v) etanol trong 4 phút và sau đó với 1,3% (v/v) axit natri hypoclorit trong 30 phút. Sau khi rửa 5 lần với nước vô trùng, độ ẩm được loại bỏ trên giấy lọc vô trùng, và hạt giống được trồng lại vào môi trường MSO (4,43 g/L muối MS, 30 g/L sucroza, 3 g/L phytigel, độ pH 5,8), và được nuôi cấy trong 5 ngày ở phòng nuôi cấy ở $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ trong điều kiện ánh sáng (16 h ánh sáng / 8 h bóng tối, 25000 Lux).

Sau khi *Agrobacterium* được biến nạp với vectơ được chèn bằng gen CyPPO8 F363M, nó được tiêm trong môi trường LB được bổ sung spectinomycin (100 mg/L) và rifampicin (50 mg/L), và được nuôi cấy trên 16 hrs trong thiết bị ủ lắc ở 28°C . Lá mầm và trụ dưới lá mầm của cây hạt cải được cắt và được nuôi cấy lại với *Agrobacterium* trong 3 ngày (điều kiện bóng tối, $25\pm 1^{\circ}\text{C}$). Các mô cây đã cấy được chuyển đến môi trường chọn (4,43 g/L muối MS, 20 g/L sucroza, 0,2 mg/L NAA, 8 μM TDZ, 0,01 mg/L GA3, 50 μM bạc thiosulfat, 10 mg/L PPT, 500 mg/L carbenixillin, 4 g/L phytigel, độ pH 5,8) và được nuôi cấy trong buồng sinh trưởng ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16 h ánh sáng/8 h bóng tối).

Các mô cây đã cấy được nuôi cấy cấp hai mọi hai tuần và sau đó chồi đã biệt hóa lại từ thể sản được chuyển đến môi trường cảm ứng rễ (4,43 g/L muối MS, 30 g/L sucroza, 3 g/L phytigel, than hoạt tính 3 g/L, độ pH 5,8), do đó cảm ứng rễ. Cây trồng nhỏ cảm ứng rễ được chuyển sang chậu, và sau đó thể biến nạp được xác nhận sử dụng lá được cắt bỏ.

8-2. Kiểm tra khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của thể biến nạp

Sau khi hạt giống của thể biến nạp hạt cải (T₁) và hạt cải Youngsan (hạt cải kiểu dại, đối chứng) được khử trùng với 50% (v/v) natri hypoclorit trong 30 phút, chúng được rửa 5 lần bằng nước vô trùng. Thể biến nạp được gieo trong môi trường chọn (1/2 MS, 50 nM tiafenacil, độ pH 5,8) và hạt cải kiểu dại được gieo trong môi trường 1/2 MS. Cả thể sống sót sau 7 ngày được trồng lại vào chậu và được nuôi cấy trong buồng sinh

trường ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16 h ánh sáng/8 h bóng tối). Sau 35 ngày cấy, 10 μM tiafenacil và 10 μM saflufenacil được xử lý lần lượt bằng 100 mL (0,05% Silwet L-77) với mỗi khay (40 x 60 cm, 0,24 m²) trong đó đặt chậu.

Các kết quả của 7 ngày sau khi xử lý thuốc diệt cỏ được thể hiện trên FIG. 54 (xử lý tiafenacil) và FIG. 55 (xử lý saflufenacil). Trên FIG. 54 và FIG. 55, “Youngsan” thể hiện hạt cải Youngsan kiểu dại. Mức tổn thương được thể hiện ở bảng 23 bằng cách đánh giá chỉ số tổn thương 0-5 (không hư hại-chết; tham chiếu đến bảng. 17):

Bảng 23

	10 μM Tiafenacil	10 μM Saflufenacil
WT (Youngsan)	4	4
CyPPO8 F363M 2-4	2	NT
CyPPO8 F363M 2-7	2	NT
CyPPO8 F363M 2-8	1	NT
CyPPO8 F363M 2-6	NT	0
CyPPO8 F363M 2-9	NT	0
CyPPO8 F363M 2-10	NT	0

(NT: Không được thử nghiệm)

Trong khi Youngsan (hạt cải kiểu dại, đối chứng) có mức tổn thương 4, dòng CyPPO8 F363M-2 có khả năng chống chịu tổn thương mức 1-2 với 10 μM tiafenacil (FIG. 54). Ngoài ra, sau khi xử lý 10 μM saflufenacil, dòng CyPPO8 F363M-2 không có hư hại (FIG. 55).

8-3. Kiểm tra biểu hiện protein của hạt cải được biến nạp

Biểu hiện của gen được chèn ở thể biến nạp hạt cải CyPPO8 F363M được xác nhận. Trong dòng CyPPO8 F363M, 5 cá thể (2-1, 2-2, 2-6, 2-9, và 2-10) được xác nhận có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được chọn để thẩm tách western.

Sau khoảng 200 mg lá của mỗi thể biến nạp hạt cải được nghiền sử dụng nitor lỏng và chày, 0,8 mL phenol (đệm Tris, độ pH 8,0) và 0,8 mL chất đệm dense SDS (30% (w/v) sucroza, 2% (w/v) SDS, 0,1 M Tris-Cl, pH 8,0, 5% (v/v) beta-mercaptoetanol)

được bổ sung và được trộn bằng cách xoay trong 30 giây, và tiến hành ly tâm ở 10000 xg trong 3 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống mới, và 5- μ l thể tích metanol (4°C, 0,1 M amoni axetat) được bổ sung và trộn, và sau đó bỏ ở -20°C trong 30 phút. Protein được kết tủa bằng cách ly tâm ở 10000 xg trong 5 phút, và được rửa bằng 1 mL metanol (4 °C, 0,1 M amoni axetat) hai lần và 80% axeton (4°C) hai lần, và sấy. Các protein đã sấy được hòa tan bằng 2% (w/v) chất đệm SDS (50 mM Tris-Cl, độ pH 6,8, 1 mM DTT).

Vì vectơ CyPPO8 F363M được tạo kết cấu với thẻ HA (tham chiếu đến ví dụ 5-1), quá trình thâm tách Western được tiến hành với kháng thể HA (Santa Cruz) để xác nhận biểu hiện protein CyPPO8 F363M.

Kết quả thâm tách Western được thể hiện ở đỉnh của FIG. 56. Được chứng minh là protein CyPPO8 được biểu hiện ở tất cả các cá thể trừ Youngsan (hạt cải kiểu dại, đối chứng). Kết quả này thể hiện rằng khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ được tạo ra bằng biểu hiện protein của gen được đưa.

Ngoài ra, kết quả nhuộm xanh Coomassie của màng PVDF được thể hiện ở cuối FIG. 56. Được chứng minh là lượng protein của mỗi mẫu hầu như bằng nhau.

Yêu cầu bảo hộ

1. Polypeptit chứa trình tự axit amin trong đó, trong SEQ ID NO: 1,

(1) Y373 được thế bằng M(Met), I(Ile), L(Leu), hoặc V(Val), R92 được thế bằng A(Ala), V173 được thế bằng S(Ser) hoặc C(Cys), A175 được thế bằng L(Leu) hoặc C(Cys), hoặc V138 được thế bằng M(Met); hoặc

(2) Y373 được thế bằng M(Met), I(Ile), L(Leu), hoặc V(Val), và ít nhất một thế được chọn từ các thế sau còn được đưa vào:

thế R92 bằng A(Ala),

thế V173 bằng S(Ser) hoặc C(Cys),

thế A175 bằng L(Leu) hoặc C(Cys), và

thế V138 bằng M(Met).

2. Polypeptit theo điểm 1, chứa trình tự axit amin trong đó, trong SEQ ID NO: 1,

(1) Y373 được thế bằng M(Met), I(Ile), L(Leu), hoặc V(Val); hoặc

(2) Y373 được thế bằng M(Met), I(Ile), L(Leu), hoặc V(Val), và ít nhất một thế được chọn từ các thế sau còn được đưa vào:

thế R92 bằng A(Ala),

thế V173 bằng S(Ser) hoặc C(Cys),

thế A175 bằng L(Leu) hoặc C(Cys), và

thế V138 bằng M(Met).

3. Polypeptit theo điểm 1 hoặc 2, chứa trình tự axit amin chứa đột biến axit amin của:

Y373M, Y373V, Y373I, Y373L,

A175C, A175L,

V318M,

R92A,

V173S, V173C,

R92A+Y373M,

V173S+Y373M,

V173S+Y373I,

V173S+Y373L,

V173S+Y373V, V173C+Y373M, V173C+Y373I, A175L+Y373M, A175L+Y373I, A175C+Y373M, A175C+Y373I, V318M+Y373M, V318M+Y373I, V318M+Y373V, V173S+V318M+Y373M, V173S+A175C+Y373M, A175C+V318M+Y373M, A175L+V318M+Y373M, V173S+A175L+Y373M, R92A+V173S+Y373M, R92A+V173S+Y373I, R92A+V173S+Y373L, R92A+V173C+Y373M, R92A+V173C+Y373L, R92A+A175C+Y373M, R92A+A175C+Y373I, R92A+A175C+Y373L, R92A+A175L+Y373M, R92A+A175L+Y373I, R92A+A175L+Y373L, R92A+V318M+Y373M, R92A+V318M+Y373I, R92A+V318M+Y373L, R92A+V318M+Y373V, V173S+A175C+Y373I, V173S+A175C+Y373L, V173C+A175L+Y373M, V173C+A175L+Y373I, V173C+A175L+Y373L, V173S+V318M+Y373I, V173S+V318M+Y373L, A175C+V318M+Y373L, R92A+V173S+A175C+Y373M, R92A+V173C+A175L+Y373L, R92A+V173S+V318M+Y373M, R92A+V173C+V318M+Y373I, R92A+V173C+V318M+Y373L, R92A+A175C+V318M+Y373M, V173S+A175C+V318M+Y373M, V173C+A175L+V318M+Y373I, V173C+A175L+V318M+Y373L,

hoặc

R92A+V173S+A175C+V318M+Y373M,

trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 1.

4. Polynucleotit mã hóa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Vector tái tổ hợp chứa polynucleotit theo điểm 4.

6. Tế bào được biến nạp chứa vector tái tổ hợp theo điểm 5.

7. Chế phẩm để tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, chứa một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm gồm polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3; polynucleotit mã hóa polypeptit; vector tái tổ hợp chứa polynucleotit; và tế bào được biến nạp chứa vector tái tổ hợp, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó thuốc diệt cỏ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm pyrimidindion, diphenyl-ete, phenylpyrazol, N-phenylphthalimit, phenyleste, thiadiazol, oxadiazol, triazolinon, oxazolidinedion, pyraclonil, flufenpyr-etyl và

profluazol.

9. Chế phẩm theo điểm 7 hoặc 8, trong đó thuốc diệt cỏ là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm gồm butafenacil, saflufenacil, benzfendizon, tiafenacil, fomesafen, oxyfluorfen, aclonifen, acifluorfen, bifenox, etoxyfen, lactofen, chlometoxyfen, chlorintofen, fluoroglycofen-ethyl, halosafen, pyraflufen-ethyl, fluazolat, flumioxazin, cinidon-ethyl, flumiclorac-pentyl, fluthiacet, thidiazimin, oxadiargyl, oxadiazon, carfentrazon, sulfentrazon, azafenidin, pentoxazon, pyraclonil, flufenpyr-ethyl, profluazol, phenopylat, chất tương tự cacbamat của phenopylat, và muối được chấp nhận dùng trong nông nghiệp của nó.

10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7-9, trong đó cây trồng hoặc tảo còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó, và khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai được tạo ra hoặc được tăng cường.

11. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7-10, trong đó thuốc diệt cỏ thứ hai được chọn từ nhóm gồm glyphosat, glufosinat, dicamba, 2,4-D(axit 2,4-Diclophenoxyaxetic), isoxaflutol, thuốc diệt cỏ ức chế ALS(axetolactat synthaza), thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II, thuốc diệt cỏ gốc phenylure, thuốc diệt cỏ gốc bromoxynil, và tổ hợp của nó.

12. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm 7-11, trong đó polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai là một hoặc nhiều polypeptit được chọn từ nhóm gồm:

EPSPS chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat (5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza kháng glyphosat), GOX (glyphosat oxidaza), GAT (glyphosat-N-axetyltransferaza) hoặc glyphosat decarboxylaza;

PAT chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat (phosphinothricin-N-axetyltransferaza);

DMO chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba (dicamba monooxyaza);

2,4-D monooxyaza hoặc AAD (aryloxyalkanoat dioxyaza) chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D (axit 2,4-diclophenoxyaxetic);

ALS (axetolactat synthaza) chống chịu thuốc diệt cỏ gốc sulfonylure ức chế ALS (axetolactat synthaza), AHAS (axetohydroxyaxit synthaza) hoặc AtAHASL (cấu trúc dưới phân tử lớn axetohydroxyaxit synthaza);

hệ quang hóa II protein D1 chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ quang hóa II;
 Cytochrom P450 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure;
 HPPD (hydroxyphenylpyruvat dioxyaza) chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế plastit;
 nitrilaza chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và
 tổ hợp của nó.

13. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó gen mã hóa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai là một hoặc nhiều gen được chọn từ nhóm gồm:

gen cp4 epsps, mepsps, 2mepsps, goxv247, gat4601 hoặc gat4621 chống chịu thuốc diệt cỏ glyphosat;

gen BAR hoặc PAT chống chịu thuốc diệt cỏ glufosinat;

gen dmo chống chịu thuốc diệt cỏ dicamba;

gen AAD-1 hoặc AAD-12 chống chịu thuốc diệt cỏ 2,4-D(axit 2,4-diclophenoxyaxetic);

gen HPPDPF W336 chống chịu thuốc diệt cỏ isoxaflutol;

gen ALS, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, GM-HRA, S4-HRA, Zm-HRA, SurA hoặc SurB chống chịu thuốc diệt cỏ sulfonylure;

gen psbA chống chịu thuốc diệt cỏ ức chế hệ thống quang hóa II;

gen CYP76B1 chống chịu thuốc diệt cỏ phenylure;

gen bxn chống chịu thuốc diệt cỏ bromoxynil; và

tổ hợp của nó.

14. Thể biến nạp của cây trồng hoặc tạo có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, hoặc dòng vô tính hoặc thể hệ con của nó, chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc polynucleotit mã hóa của nó, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

15. Thể biến nạp, dòng vô tính, hoặc thể hệ con của nó theo điểm 14, trong đó thể biến nạp là tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sần, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây.

16. Phương pháp chuẩn bị cây trồng hoặc tảo chuyển gen có khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ, phương pháp này bao gồm biến nạp tảo, tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sản, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây bằng polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc polynucleotit mã hóa của nó, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

17. Phương pháp tạo ra hoặc tăng cường khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng hoặc tảo, phương pháp này bao gồm biến nạp tảo, tế bào cây trồng, tế bào trần, thể sản, trụ dưới lá mầm, hạt giống, lá mầm, chồi, hoặc toàn bộ cây bằng polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc polynucleotit mã hóa của nó, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza.

18. Phương pháp kiểm soát cỏ dại trên đất trồng trọt, phương pháp này bao gồm:

cung cấp cho đất trồng trọt cây trồng chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc polynucleotit mã hóa của nó, và

sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt được thực hiện bằng cách sử dụng liều lượng có hiệu quả của hai hoặc nhiều hơn hai loại thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza lần lượt hoặc đồng thời.

20. Phương pháp theo điểm 18,

trong đó cây trồng còn chứa polypeptit chống chịu thuốc diệt cỏ thứ hai hoặc gen mã hóa của nó, và

bước sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho đất trồng trọt được thực hiện bằng cách sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza và thuốc diệt cỏ thứ hai được áp dụng lần lượt hoặc đồng thời.

21. Phương pháp loại bỏ sinh vật thủy sinh không mong muốn khỏi môi trường nuôi cấy, phương pháp này bao gồm:

cung cấp cho môi trường nuôi cấy tảo chứa polypeptit theo điểm bất kỳ trong số

các điểm từ 1 đến 3 hoặc polynucleotit mã hóa của nó, và

sử dụng liều lượng có hiệu quả của thuốc diệt cỏ ức chế protoporphyrinogen oxidaza cho môi trường nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	FarmHannong Co., Ltd.	
<120>	POLYPEPTIT BIẾN THỂ CỦA PROTOPORPHYRINOGEN OXIDAZA, CHẾ PHẨM TẠO RA VÀ/HOẶC TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU THUỐC DIỆT CỎ CỦA CÂY TRỒNG CHỨA POLYPEPTIT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CỎ ĐẠI	
<130>	OPP20173125KR	
<150>	KR 10-2016-0075357	
<151>	2016-06-16	
<160>	164	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	486	
<212>	PRT	
<213>	Oscillatoria nigroviridis PCC 7112	
<220>		
<221>	PEPTIT	
<222>	(1)..(486)	
<223>	CyPPO2	
<400>	1	
	Met Glu Leu Leu Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu	15
	1 5 10	
	Ser Leu Ala His Ala Leu His Lys Glu Ala Thr Ser Ala Ser Pro Leu	30
	20 25 30	
	Lys Ile Leu Val Ala Glu Ser Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr	45
	35 40 45	
	Thr Val Thr Ala Glu Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe	60
	50 55 60	
	Ser Pro Thr Pro Glu Leu Met Lys Leu Ala Val Asp Val Gly Leu Lys	80
	65 70 75	
	Gln Glu Leu Ile Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Phe Val Tyr Trp	95
	85 90	
	Glu Asn Lys Leu Gln Pro Val Pro Met Thr Pro Pro Ala Met Ile Gln	110
	100 105 110	
	Ser Gln Leu Leu Ser Phe Pro Gly Lys Leu Arg Ala Leu Phe Gly Ala	125
	115 120 125	
	Leu Gly Phe Val Ala Pro Ala Met Gly Asp Arg Leu Ser Gln Gln Gly	140
	130 135 140	

Asn Glu Glu Thr Val Ser Gln Phe Phe Arg Arg His Leu Gly Thr Glu	145	150	155	160
Val Met Gln Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala Gly	165	170	175	
Asp Pro Gln Gln Leu Ser Ala Ala Ala Phe Gly Arg Val Ala Lys	180	185	190	
Met Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Leu Leu Ser Ala	195	200	205	
Lys Asn Arg Pro Lys Lys Met Pro Ala Asp Pro Asn Val Pro Lys Thr	210	215	220	
Lys Pro Gly Glu Leu Gly Ser Phe Lys Gln Gly Leu Lys Ala Leu Pro	225	230	235	240
Glu Ala Ile Ala Ala Lys Leu Gly Asp Arg Val Lys Leu Asn Trp His	245	250	255	
Leu Thr Arg Leu Gln Arg Thr Glu Arg Glu Thr Tyr Ile Ala Glu Phe	260	265	270	
Ser Thr Pro Asp Gly Gln Gln Glu Val Glu Ala Arg Thr Val Val Leu	275	280	285	
Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Asp Leu Leu Gln Pro Leu Glu Pro	290	295	300	
Gln Val Ser Ser Ala Leu Gln Ala Phe Thr Tyr Pro Thr Val Ala Ser	305	310	315	320
Val Val Leu Ala Tyr Pro Gln Ser Asp Val Lys Gly Lys Leu Val Gly	325	330	335	
Phe Gly Asn Leu Ile Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Cys Leu Gly Thr	340	345	350	
Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Pro Asp Arg Ala Pro Ala Gly Trp Gln	355	360	365	
Thr Leu Thr Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp Ser Glu Ile Gly Asn	370	375	380	
Leu Asp Ser Glu Gln Ile Val Arg Glu Val His Arg Asp Leu Ser Arg	385	390	395	400
Ile Leu Leu Lys Pro Asp Val Pro Gln Pro Lys Val Leu Thr Val Lys	405	410	415	
Leu Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly His Phe Asp Arg	420	425	430	

Leu Gln Gln Ile Asp Glu Gly Leu Lys Ser Leu Pro Gly Val Tyr Leu
435 440 445

Cys Ser Asn Tyr Val Gly Gly Val Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg Arg
450 455 460

Gly Phe Asp Arg Ala Arg Glu Val Gly Glu Tyr Leu Gln Lys Lys Gln
465 470 475 480

Ser Asp Thr Arg Ser Ile
485

<210> 2
<211> 1461
<212> ADN
<213> Oscillatoria nigroviridis PCC 7112

<220>
<221> gen
<222> (1)..(1461)
<223> CyPPO2

<400> 2
atggaactat tagatacctt gattgtgggt gcgggtatta gcggttgag ttggcgcac 60

gcattcaca aggaagcaac gattgcatcg ccgctgaaga ttttagtcgc tgagagtcag 120

ggacgtgtgg gcgggaacat cactactgtg acagcagagg ggtttctctg ggaggagggc 180

ccgaacagtt ttgcgccgac gccggaattg atgaagtgg ctgtggatgt gggattgaag 240

caggagtga ttttgcga tcgcaaattg cctcgtttg tgtattgga aaataagctg 300

caaccgtgc cgatgactcc accggcgatg attcagtcct agttgctgag tttccgggg 360

aaactgcggg cggtgttcgg ggctttgggg ttgtcgcgc cggcaatggg cgatcgactt 420

tcgcagcagg gtaacgagga aacagtttct caattttcc gccgtcatct cggtagcgaa 480

gtgatgcagc ggttggtgga acctttgtt tctgggggtt atgccggcga tccgcaaaa 540

cttagcgcgg cggcggcttt tggccgggta gccaaagatgg ctgatgtggg tggcgggctg 600

gtggcggggg cgctgcttc tgctaaaaac agaccgaaga aaatgcctgc agaccggaat 660

gttctaaaa ctaagccggg ggagtgggt tcgtcaagc aggggttgaa ggctttgcca 720

gaggcgatcg ctgctaagt ggccgatcga gtgaaactca actggcactt gactgcctc 780

cagcgcacag aacgcgaaac ttacattgct gaattctcga cggccgacgg acagcaggaa 840

gttagggcgc gcacctgggt ttgacaacg cccgcttacg ttacagccga ttgttgcaa 900

```

cctctggaac cgcaagttag cagcgcttta caagctttta cttatctac ggttgctcc      960
gttgtcttag catacccgca gtcggatgtc aagggtaaat tagtgggttt tggaaattta    1020
attccgagggg ggcaggggaat tcgctgtctc gggacgattt ggacatcgag ttatttccc    1080
gatcgcgcgc ctgcagggtg gcaaaacttc accagttaca tcggcggggc aacagactcg    1140
gaaattggca atctcgactc agaacaaatc gtcgggaggg tacaccgaga ttgtctcgg      1200
at ttgtctga aaccagatgt gccacagcca aaagttttta cggatgaagct gtggaacgg      1260
gcgattcctc agtacaattt ggggcatttc gatcgcctgc aacaaatcga tgagggctta    1320
aaatctttgc ctgagtgta ttgtgcagc aactacgttg gcggagtggc ttgggagat      1380
tgcgtcgaa ggggttcga tcgtgcgca gaagtggcg agtatttga gaagaaaca      1440
tcagatactc gatcgatctg a                                             1461

```

```

<210>      3
<211>      479
<212>      PRT
<213>      Lyngbya sp. PCC 8106

```

```

<220>
<221>      PEPTIT
<222>      (1)..(479)
<223>      CyPPO4

```

```

<400>      3
Met Thr His Val Leu Asp Ser Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly      15
  1             5             10
Leu Ala Leu Ala His Ala Leu His Gln Asn Gln Asp His Gln Leu Pro
  20             25             30
Leu Asn Ile Leu Val Ser Glu His Gln Gly Arg Val Gly Gly Asn Ile
  35             40             45
Thr Thr Val Ser Glu Gly Glu Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser
  50             55             60
Phe Ser Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Leu Ala Val Glu Val Gly Leu      80
  65             70             75
Lys Pro Glu Leu Val Phe Ala Asp Arg Lys Leu Pro Arg Tyr Val Tyr      95
  85             90
Trp Asn Gly Gln Leu Met Pro Val Pro Met Ser Pro Pro Ala Leu Leu
  100            105            110

```

Ser Thr Lys Leu Leu Ser Pro Gly Gly Lys Leu Arg Ala Leu Thr Gly	
115 120 125	
Ala Leu Gly Phe Val Gln Pro Ala Met Gly Glu Ser Leu Ser Gln Gln	
130 135 140	
Asn Gly Glu Glu Thr Ile Ser Gln Phe Phe Glu Arg His Leu Gly Ser	
145 150 155	160
Glu Val Leu Lys Arg Leu Val Glu Pro Phe Val Ser Gly Val Tyr Ala	
165 170	175
Gly Asp Pro Gln Gln Leu Glu Ile Ser Ser Ala Phe Ala Arg Val Ala	
180 185 190	
Arg Met Ala Tyr Ser Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Val Leu Ser	
195 200 205	
Arg Arg Gln Asn Lys Ser Pro Arg Ser Pro Ala Asp Pro Ser Ile Pro	
210 215 220	
Gln Thr Lys Arg Gly Glu Leu Gly Ser Phe Arg Gln Gly Ile Gly Ala	
225 230 235	240
Leu Pro Asn Ala Ile Ala Lys Gln Leu Gly Asp Gln Leu Lys Leu Asn	
245 250	255
Trp Gln Leu Thr Arg Leu Glu Arg Thr Glu Asn Gln Thr Tyr Arg Ala	
260 265 270	
Glu Phe Ser Thr Pro Glu Gly Val Gln Gln Val Glu Thr Arg Thr Val	
275 280 285	
Val Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Glu Ile Leu Lys Pro Leu	
290 295 300	
Gln Leu Gln Val Ser Gln Thr Leu Thr Glu Ile Pro Tyr Pro Pro Val	
305 310 315	320
Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Val Ser Ala Leu Lys Gln Lys Leu	
325 330	335
Thr Gly Phe Gly Asn Leu Val Pro Arg Gly Gln Gly Ile Arg Thr Leu	
340 345 350	
Gly Thr Ile Trp Thr Ser Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Gln Gly	
355 360 365	
Trp Gln Val Leu Thr Ser Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asp Pro Glu Ile	
370 375 380	
Gly Glu Leu Glu Asp Asp Gln Ile Val Glu Ala Val His Gln Asp Leu	
385 390 395	400

Arg His Ile Leu Leu Lys Glu Asp Ile Ser Pro Lys Val Leu Ala Val
405 410 415

His Leu Trp Lys Arg Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu Gly His Gln Gln
420 425 430

Arg Leu Gln His Val Asn Glu Gly Leu Glu Ala Met Pro Gly Leu Tyr
435 440 445

Leu Cys Ser Asn Tyr Ile Asp Gly Val Ala Leu Gly Asp Cys Val Arg
450 455 460

Arg Ser Ile Gly Gln Ala Asn Glu Ile Leu Ser Phe Leu Gly Gln
465 470 475

<210> 4
<211> 1440
<212> ADN
<213> Lyngbya sp. PCC 8106

<220>
<221> gen
<222> (1)..(1440)
<223> CyPPO4

<400> 4
atgactcaag tactcgatag tttatcgtc ggtgcaggca ttagcggcct ggcgttagct 60

catgctctcc atcagaacca agatcatcaa ttgcctctca acattcttgt cagcgagcat 120

caaggacggg taggaggaaa tataaccaca gtatccgaag gagaattct ttgggaagaa 180

ggccccaata gttttctcc aaccctgag ttactgaagt tagcggtaga agtaggtctt 240

aagcctgagc tagtctttgc cgatcgcaag ttacctcggc acgtttactg gaatggtaa 300

ctcatgcctg tgccgatgag tctccggct ttgttgagta caaaactctt aagtcctgga 360

ggtaaacttc gagcattaac gggggcattg gggttgtac aaccgcgat gggagaatcg 420

ttaagtcaac aaaatgggga agaaacgac tcgcagtttt ttgagcgta ttgggttca 480

gaagttctca agcgactggt tgaaccctt gttctggtg ttatgcagg cgatccccag 540

caactcgaat ttagctcggc tttgcccga gtcgcacgta tggcttacag tggcggtgga 600

ttggttgctg gagcggtttt atcgcgtcgt cagaacaaat ctccgcgac gcctgccgac 660

ccgtctattc cccaaactaa acggggagag ttgggtctt ttctcaggg gattggagcc 720

ttaccaatg cgatcgccaa acagttaggc gatcaactca aattaaactg gcaactcacc 780

cgtctcgaac ggactgaaaa ccaaacctat cgggctgaat ttctgactcc agaaggggtt 840
 caacaggtag aaactcgaac ggtggtgttg acgactccgg cctatgtcac agcagaaatt 900
 ctcaaaccgt tgcaactcca agtcagtcaa acgttaactg aaattcccta tcccccggtg 960
 gcttgcgctg ttttagccta tcccgtttca gctttaaagc agaaattaac cggatttggc 1020
 aatttagttc cccgaggaca agggattcgg acgttaggca cgatttgac atcgagtta 1080
 ttctctggtc gcgcccccca aggtggcaa gtcctacca gttatattgg cggagcgacg 1140
 gatccagaaa ttggagagtt agaagatgat caaattgttg aggcgggtca tcaagattg 1200
 cgtcacattt tactcaaaga agatatctct cccaaagtgc tagccgtgca tctgtggaaa 1260
 cgtgctatcc ctcaatacaa tctcggacac caacaacgt tacaacacgt taatgagggt 1320
 ctagaggcaa tgccgggggtt atatctgtgt agcaactata tcgacgggtg agcgttggga 1380
 gattgtgtgc gtcgttctat cggacaagct aacgaaattc tcagttttt gggtcaatag 1440

1440

<210> 5
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Halotheca sp. PCC 7418

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(466)
 <223> CyPPO8

<400> 5
 Met Ile Asp Thr Leu Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Tyr Arg Leu Asp Glu Lys Gln Arg Gln Val Leu Val Ala Glu Lys
 20 25 30
 Arg Asp Arg Ala Gly Gly Asn Ile Thr Ser Gln Gln Ser Gly Asp Phe
 35 40 45
 Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Ser Pro Thr Pro Glu Leu Leu
 50 55 60
 Lys Leu Ala Val Asp Ala Gly Leu Arg Asn Glu Leu Ile Phe Ala Asp
 65 70 75 80
 Arg Gly Leu Pro Arg Tyr Val Tyr Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val

	85	90	95	
Pro Met Ser Pro Pro Thr Ala Val Thr Ser Gln Leu Leu Ser Pro Ile				
	100	105	110	
Gly Lys Leu Arg Ala Leu Thr Gly Ala Leu Gly Phe Ile Pro Pro Gln				
	115	120	125	
Val Ser Ser Gln Glu Glu Thr Val Ala Asp Phe Phe Thr Arg His Leu				
	130	135	140	
Gly Ser Glu Val Ala Gln Arg Leu Val Ser Pro Phe Val Ser Gly Val				
145	150	155	160	
Tyr Ala Gly Asp Val Asp Gln Leu Ser Ala Glu Ala Ala Phe Gly Arg				
	165	170	175	
Val Thr Gln Leu Ala Asp Val Gly Gly Gly Leu Val Ala Gly Ala Ile				
	180	185	190	
Leu Cys Arg Arg Gln Lys Pro Lys Ser Thr Pro Lys Thr Ala Lys Pro				
	195	200	205	
Ser Asp Ile Pro Glu Thr Lys Ser Gly Gln Leu Gly Ser Phe Lys Glu				
	210	215	220	
Gly Leu Gln Gln Leu Pro Ser Ala Ile Val Ser Gln Leu Gly Asp Lys				
225	230	235	240	
Val Lys Phe Gln Trp Glu Leu Lys Asn Ile Ser Pro His Pro Glu Ser				
	245	250	255	
Gly Tyr Val Ala Thr Phe Ser Thr Pro Glu Gly Glu Gln Thr Val Glu				
	260	265	270	
Ala Lys Thr Val Ile Leu Thr Thr Pro Ala Tyr Val Thr Ala Ser Leu				
	275	280	285	
Val Lys Asp Leu Ser Pro Gln Ala Ser Gln Ala Leu Asn Glu Ile Ser				
	290	295	300	
Tyr Pro Pro Val Ala Cys Val Val Leu Ala Tyr Pro Asp Glu Ala Leu				
305	310	315	320	
Arg Phe Pro Leu Lys Gly Phe Gly Asn Leu Asn Pro Arg Ser Gln Gly				
	325	330	335	
Ile Arg Thr Leu Gly Thr Ile Trp Ser Ser Thr Leu Phe Pro Gly Arg				
	340	345	350	
Thr Pro Lys Gly Trp His Leu Leu Thr Asn Phe Ile Gly Gly Ala Thr				
	355	360	365	
Asp Pro Ala Ile Ala Glu Leu Ser Glu Asp Gln Ile Ile Glu Gln Val				

370	375	380	
His Gln Asp Leu Gln Gln Ala Val Ile Lys Ser Gly Ser Ile Pro Lys			
385	390	395	400
Pro Leu Ala Val His Leu Trp Ser Lys Ala Ile Pro Gln Tyr Asn Leu			
405	410		415
Gly His Leu Lys Arg Leu Glu Thr Ile Arg Asn His Leu Lys Pro Phe			
420	425		430
Ser Gly Leu Phe Leu Ser Ser Asn Tyr Leu Asp Gly Val Ala Leu Gly			
435	440		445
Asp Cys Val Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Gln Ala Val Leu Asp Tyr			
450	455		460
Leu Gly			
465			
<210>	6		
<211>	1401		
<212>	ADN		
<213>	Halotheca sp. PCC 7418		
<220>			
<221>	gen		
<222>	(1)..(1401)		
<223>	CyPPO8		
<400>	6		
atgatagata ctttaattgt gggagcaggg attagtgggt taagtgtctgc gtatcgactc			60
gatgagaagc agcgccaagt gctggttgca gaaaagcgcg atcgcgctgg gggaaatatc			120
accagccaac aaagtggcga ttctctctgg gaagaaggac cgaacagttt ttctcccaca			180
ccagaactcc taaaactagc ggttgatgcg ggcttaagaa atgagttaat ctttgctgat			240
cgcggacttc cccgttatgt ttattgggag gggaaactgc gccctgttcc tatgagtcce			300
cccacagccg tgacatccca gttgctgagt ccaatcggga aactacgggc gtaacgggt			360
gcattaggct ttattccccc gcaagtgtcg agtcaggaag aaacgggtgc ggactttttt			420
accgcgtatc tcggttcaga agtagcccaa cggtagtgga gtccgtttgt gtctgggggt			480
tatgcagggg atgtggatca actcagtgcg gaagctgcat ttggacgagt tacccaactg			540
gcggatgtgg gcggtggact ggtcgcaggt gcgattttat gtcgtcgtca aaagccaaag			600
tcaaccccaa aaacggctaa accgtctgat attccagaaa caaagtctgg acagttaggt			660

tcatttaagg aaggattaca acaattaccc agcgcgatcg ttctcaact gggagacaaa	720
gtaaagtffc aatgggaact gaaaaatata tccctcatc cagaatcggg ttacgtcgcg	780
acattttcca caccagaggg agaacaaaca gtcgaagcca aaaccgttat cctcaccact	840
cccgcctacg ttaccgcctc tctggtaaaa gatttatcac ctcaagccag tcaagcctta	900
aacgaaattt cctatcccc cgtagcttgt gtggtcttag cctatccga tgaagccctc	960
cgttttcccc tcaaaggatt tggtaatctt aaccctcgca gtcaaggaat ccgcactctt	1020
ggtaacaatt ggagttcaac actctttcca ggacgcacgc cgaaagggtg gcactcttta	1080
accaatttta ttggcgggtg aactgatccc gcaattgctg aactcagtga agatcaaatt	1140
attgaacaag tccatcaaga cttacaacaa gcggtgatta aatcggaag tatcccgaaa	1200
cccttagccg ttcatttggt gtcaaaagcg attccgcaat acaatctcgg acatctgaaa	1260
cggtagaaaa ccattccgca tcaactaaaa cccttctctg gactctttt atcgagtaac	1320
tatctcgatg gcgttgcgtt ggggtgattgt gtgcgccgag gggaagagag tagtcaagcc	1380
gtgtagatt atttgggtta a	1401

<210> 7
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(537)
 <223> AtPPO1 kiểu đại

<400> 7
 Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
 1 5 10 15
 Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
 20 25 30
 Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
 35 40 45
 Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
 50 55 60
 Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro

65	70	75	80
Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly			
	85	90	95
Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly			
	100	105	110
Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp			
	115	120	125
Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg			
	130	135	140
Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr			
	145	150	155
			160
Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala			
	165	170	175
Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu			
	180	185	190
Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu			
	195	200	205
Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser			
	210	215	220
Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln			
	225	230	235
			240
Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg			
	245	250	255
Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln			
	260	265	270
Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu			
	275	280	285
Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu			
	290	295	300
Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu			
	305	310	315
			320
Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr			
	325	330	335
Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser			
	340	345	350
Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val			

355 360 365
 Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
 370 375 380
 Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
 405 410 415
 Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
 420 425 430
 Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
 435 440 445
 Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
 450 455 460
 Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
 465 470 475 480
 Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
 485 490 495
 Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
 500 505 510
 Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
 515 520 525
 Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

 <210> 8
 <211> 1614
 <212> ADN
 <213> Arabidopsis thaliana

 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1614)
 <223> AtPPO1 kiểu dại

 <400> 8
 atggagtat ctcttctcgc tccgacgact caatcgcttc ttccgtcgtt ttgaagccc 60

 aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccggt gttagtggtc cggtggacca 120

 accgtcggat ctcaaaaat cgaaggcgga ggaggcacca ccatcacgac ggattgtgtg 180

attgtcggcg gaggtattag tggctttgc atcgctcagg cgcttgctac taagcatcct	240
gatgctgctc cgaattaat tgtaccgag gctaaggatc gtgttgagg caacattatc	300
actcgtgaag agaattggtt tctctgggaa gaaggccca atagtttca accgtctgat	360
cctatgctca ctatgggtgt agatagtggt ttgaaggatg atttggtgtt gggagatcct	420
actgcgcaa ggtttgtgtt gtggaatggg aaattgaggc cggttccatc gaagctaaca	480
gacttacgt tctttgatt gatgagtatt ggtgggaaga ttgagctgg ttttggtca	540
cttggcattc gaccgtcacc tccaggtcgt gaagaatctg tggaggagt tgtacggcgt	600
aacctcgggt atgagggttt tgagcgctg attgaacctg ttgttcagg tgtttatgct	660
ggtgatcctt caaaactgag catgaaagca gcgtttggga aggtttggaa actagagcaa	720
aatggtggaa gcataatagg tggactttt aaggcaatc aggagaggaa aaacgctccc	780
aaggcagaac gagaccgcg cctgccaaaa ccacagggcc aaacagttgg ttcttcagg	840
aagggacttc gaatgttgc agaagcaata tctgaagat taggtagcaa agttaagtg	900
tcttgaagc tctcaggtat cactaagctg gagagcggag gatacaactt aacatatgag	960
actccagatg gtttagttc cgtgcagagc aaaagtgtt taatgacgtt gccatctcat	1020
gttgcaagt gtctcttgc ccctcttct gaatctgctg caaatgcact ctcaaaacta	1080
tattaccac cagttgcagc agtatctatc tcgtaccga aagaagcaat ccgaacagaa	1140
tgttgatag atggtgaact aaagggtttt gggcaattgc atccacgcac gcaaggagt	1200
gaaacattag gaactatcta cagctcctca ctcttccaa atcgcgcacc gcccggaaga	1260
attttctgt tgaactacat tggcgggtct acaaaccg gaattctgtc caagtctgaa	1320
ggtgagttag tggaagcagt tgacagagat ttgaggaaaa tgctaattaa gcctaattcg	1380
accgatccac ttaaattagg agttagggtta tggcctcaag ccattctca gtttctagt	1440
ggtcactttg atatccttga cacggctaaa tcctctctaa cgtctcggg ctacgaagg	1500
ctatctttgg gtggcaatta cgtcgtggt gtagccttag gccggtgtgt agaaggcgca	1560
tatgaaccg cgattgaggt caacaacttc atgtcacggt acgcttaca gtaa	1614

<210> 9
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> AtPPO1 loại đột biến

<400> 9

Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser

1 5 10 15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu

20 25 30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu

35 40 45

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly

50 55 60

Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro

65 70 75 80

Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly

85 90 95

Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly

100 105 110

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp

115 120 125

Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg

130 135 140

Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr

145 150 155 160

Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala

165 170 175

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu

180 185 190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu

195 200 205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser

210 215 220

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln

225 230 235 240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg

245 250 255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln

260	265	270	
Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu			
275	280	285	
Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu			
290	295	300	
Leu Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu			
305	310	315	320
Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr			
325	330		335
Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser			
340	345	350	
Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val			
355	360	365	
Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp			
370	375	380	
Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val			
385	390	395	400
Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala			
405	410		415
Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Met Ile Gly Gly Ser Thr Asn			
420	425	430	
Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp			
435	440	445	
Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu			
450	455	460	
Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val			
465	470	475	480
Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser			
485	490		495
Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala			
500	505	510	
Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn			
515	520	525	
Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys			
530	535		

<210> 10
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> cTP(peptit chuyển tiếp lục lạp)

<400> 10
 atggagtat ctcttctccg tccgacgact caatcgcttc ttccgtcgtt ttcgaagccc 60
 aatctccgat taaatgttta taagcctctt agactccggtt gttcagtggc cgggtggacca 120
 accgtcggat cttcaaaaat cgaaggcgga ggagggc 156

<210> 11
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> thê HA(hemagglutinin)

<400> 11
 atgtatcctt atgatgttcc agattatgct agtcttatgt acccatacga cgtgcctgac 60
 tacgcatcat tg 72

<210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi CyPPO2_F

<400> 12
 ccccgatcc atggaacttc ttgatactct 30

<210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mồi CyPPO2_R

<400>	13		
ccccctcgag gattgacctg gtatcactct			30
<210>	14		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi CyPPO4_F		
<400>	14		
ccccggatcc atgacccatg ttttggattc			30
<210>	15		
<211>	35		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi CyPPO4_R		
<400>	15		
ccccctcgag ctgtcctaaa aatgataaaa tctcg			35
<210>	16		
<211>	33		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi CyPPO8_F		
<400>	16		
ccccggatcc atgatatagata ctcttatagt ggg			33
<210>	17		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	đoạn mồi CyPPO8_R		
<400>	17		
ccccctcgag tcctaagtaa tctaaaactg			30

<210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_Y373M

<400> 18
 gacctctatg attggtggag ctactgatag 30

<210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_Y373M

<400> 19
 accaatcata gaggtcaatg ttgccatcc 30

<210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_Y373V

<400> 20
 gacctctgtg attggtggag ctactgatag 30

<210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_Y373V

<400> 21
 accaatcaca gaggtcaatg ttgccatcc 30

<210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_Y373I

<400> 22
 gacctctatc attggtggag ctactgatag 30

<210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_Y373I

<400> 23
 accaatgata gaggtcaatg ttgccatcc 30

<210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_Y373T

<400> 24
 gacctctaca attggtggag ctactgatag 30

<210> 25
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_Y373T

<400> 25
 accaattgta gaggtcaatg ttgccatcc 30

<210> 26
 <211> 30

<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_Y373L	
<400>	26	
	gacctctttg attggtggag ctactgatag	30
<210>	27	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_Y373L	
<400>	27	
	accaatcaaa gaggtcaatg ttgccatcc	30
<210>	28	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_Y373C	
<400>	28	
	gacctcttgt attggtggag ctactgatag	30
<210>	29	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_Y373C	
<400>	29	
	accaatacaa gaggtcaatg ttgccatcc	30
<210>	30	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_A175C

<400> 30
 ggtgtgtact gtggagatcc tcaacagctc 30

<210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_A175C

<400> 31
 aggatctcca cagtacacac cagaacaaaa 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_A175L

<400> 32
 ggtgtgtact tgggagatcc tcaacagctc 30

<210> 33
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_A175L

<400> 33
 aggatctccc aagtacacac cagaacaaaa 30

<210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_V318M

<400> 34
tatccaacaa tggcttcagt tgtgttgga 30

<210> 35
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_V318M

<400> 35
aactgaagcc attgttgat aagtgaatgc 30

<210> 36
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_G351A

<400> 36
cgctgtctcg ctacgatttg gacatcgagt 30

<210> 37
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_G351A

<400> 37
ccaaatcgta gcgagacagc gaattccctg 30

<210> 38
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_S63T

<400>	38	
	gcccgaacac ttttcgccg acgccggaat tg	32
<210>	39	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi ngược cho CyPPO2_S63T	
<400>	39	
	ggcgaaaaag tgttcgggcc ctctcccag	30
<210>	40	
<211>	34	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi xuôi cho CyPPO2_R92A	
<400>	40	
	caaattgcct gcttttgtgt attgggaaaa taag	34
<210>	41	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi ngược cho CyPPO2_R92A	
<400>	41	
	atacacaaaa gcaggcaatt tgcgatcggc	30
<210>	42	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi xuôi cho CyPPO2_V173S	

<400>	42	
gtttctggga gttatgccgg cgatccgcaa c		31
<210>	43	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_V173S	
<400>	43	
ccggcataac tccagaaac aaaaggttcc		30
<210>	44	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_V173C	
<400>	44	
gtttctgggt gttatgccgg cgatccgcaa c		31
<210>	45	
<211>	32	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_V173C	
<400>	45	
ccggcataac acccagaaac aaaaggttcc ac		32
<210>	46	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_V173T	
<400>	46	
gtttctggga cttatgccgg cgatccgcaa c		31

<210> 47
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_V173T

<400> 47
 ccggcataag tcccagaaac aaaaggtcc ac 32

<210> 48
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_L229F

<400> 48
 actaagccgg gggagttcgg ttcgtcaag cag 33

<210> 49
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_L229F

<400> 49
 ctgcttgaac gaaccgaact cccccggctt agt 33

<210> 50
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_L340I

<400> 50
 ttttgaaat ataattccga gggggcaggg 30

<210> 51
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi ngược cho CyPPO2_L340I

<400> 51
 ctcggaatta tatttcaaa acccactaat ttac

34

<210> 52
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi xuôi cho CyPPO2_I353T

<400> 52
 tcgggacgac ttggacatcg agtttatttc c

31

<210> 53
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi ngược cho CyPPO2_I353T

<400> 53
 gatgtccaag tcgtcccgag acagcgaatt c

31

<210> 54
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi xuôi cho CyPPO2_I353L

<400> 54
 ctcgggacgc ttggacatc gagtttattt

30

<210> 55
 <211> 30

<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_I353L	
<400>	55	
	atgtccaaag cgtcccgaga cagcgaattc	30
<210>	56	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_I353V	
<400>	56	
	actaagccgg gggagttcgg ttcgttcaag cag	33
<210>	57	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_I353V	
<400>	57	
	ctgettgaac gaaccgaact cccccggctt agt	33
<210>	58	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_I353C	
<400>	58	
	tcgggacgtg ttggacatcg agtttatttc c	31
<210>	59	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	

<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_I353C	
<400>	59	
	gatgtccaac acgtcccgag acagcgaatt c	31
<210>	60	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_V318T	
<400>	60	
	tatcctacga ctgcctccgt tgtcttagca	30
<210>	61	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_V318T	
<400>	61	
	aacggaggca gtcgtaggat aagtaaaagc	30
<210>	62	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_E228A	
<400>	62	
	aaaactaagc cgggggcggtt gggttcgttc aag	33
<210>	63	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		

<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_E228A

<400> 63

cttgaacgaa cccaacgccc ccggcttagt ttt

33

<210> 64

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_P91L

<400> 64

aaactctta gattcgtgta ttgggaaaac

30

<210> 65

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_P91L

<400> 65

acgaatctaa gaagttttct atctgcgaat

30

<210> 66

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_P316A+V318L

<400> 66

gcttttactt atgctacgct tgcctccgtt

30

<210> 67

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_P316A+V318L

<400> 67
gacaacggag gcaagcgtag cataagtaaa 30

<210> 68
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_P316L+V318L

<400> 68
gcttttactt atcttacgct tgcctcgtt 30

<210> 69
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_P316L+V318L

<400> 69
gacaacggag gcaagcgtaa gataagtaaa 30

<210> 70
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi xuôi cho CyPPO2_F337V

<400> 70
ttagtgggtg ttggaattt aattccgagg gg 32

<210> 71
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mỗi ngược cho CyPPO2_F337V

<400>	71	
taaattcca acaccacta attaccctt gac		33
<210>	72	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_T352V	
<400>	72	
tgtctcgggg tgatttgac atcgagtta ttt		33
<210>	73	
<211>	32	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_T352V	
<400>	73	
gtccaaatca ccccgagaca gcgaattccc tg		32
<210>	74	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_V173L	
<400>	74	
gtttctgggc tttatgccgg cgatccgcaa c		31
<210>	75	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_V173L	
<400>	75	
cggcataaag cccagaaaca aaaggtcca c		31

<210> 76
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_A175I

<400> 76
 gttctgagg ttatattgg cgatccgcaa 30

<210> 77
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_A175I

<400> 77
 ttgtgcgga tcgccaatat aaaccccgaa 30

<210> 78
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_L340V

<400> 78
 ttttgaaat gttattccaa gaggtcaagg aatc 34

<210> 79
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_L340V

<400> 79
 cttggaataa catttcaaaa acccagagt tt 32

<210> 80
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_L340T

<400> 80
 ttttggaat actattccaa gaggtcaagg 30

<210> 81
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_L340T

<400> 81
 ctggaatag tatttccaaa acccagagt tttc 34

<210> 82
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi xuôi cho CyPPO2_F169A

<400> 82
 ccagaaacag caggtccac caaccgctgc atc 33

<210> 83
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi ngược cho CyPPO2_F169A

<400> 83
 gtggaacctg ctgtttctgg ggtttatgcc g 31

<210> 84
 <211> 30

<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi F cho CyPPO4_Y375M	
<400>	84	
	cttacatcta tgattggtgg agctaccgat	30
<210>	85	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi R cho CyPPO4_Y375M	
<400>	85	
	ccaccaatca tagatgtaag aacctgccat	30
<210>	86	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi R cho CyPPO4_Y375V	
<400>	86	
	cttacatctg ttattggtgg agctaccgat	30
<210>	87	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi R cho CyPPO4_Y375V	
<400>	87	
	ccaccaataa cagatgtaag aacctgccat	30
<210>	88	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	

<220>
 <223> Đoạn mồi F cho CyPPO4_Y375I

<400> 88
 cttacatcta tcattggtgg agctaccgat 30

<210> 89
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R cho CyPPO4_Y375I

<400> 89
 ccaccaatga tagatgtaag aacctgccat 30

<210> 90
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F cho CyPPO4_Y375T

<400> 90
 cttacatcta ccattggtgg agctaccgat 30

<210> 91
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R cho CyPPO4_Y375T

<400> 91
 ccaccaatgg tagatgtaag aacctgccat 30

<210> 92
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi F cho CyPPO4_Y375C

<400> 92
cttacatctt gtattggtgg agctaccgat 30

<210> 93
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi R cho CyPPO4_Y375C

<400> 93
ccaccaatac aagatgtaag aacctgccat 30

<210> 94
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi F cho CyPPO4_A176C

<400> 94
ggtgtgtatt gtggagatcc acaacagctt 30

<210> 95
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi R cho CyPPO4_A176C

<400> 95
tggatctcca caatacacac cagaaacaaa 30

<210> 96
<211> 30
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi F cho CyPPO4_A176L

<400>	96	
	gggtgtgtatt tgggagatcc acaacagctt	30
<210>	97	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO4_A176L	
<400>	97	
	tggatctccc aaatacacac cagaaacaaa	30
<210>	98	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO4_P318L+V320L	
<400>	98	
	attccttatt tgccattggc ttgtgtgtg ctc	33
<210>	99	
<211>	34	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO4_P318L+V320L	
<400>	99	
	aacacaagcc aatggcaaat aaggaatttc tgta	34
<210>	100	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO4_V320M	
<400>	100	

tatcctccaa tggcttgtgt tgtgctcgca

30

<210> 101
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO4_V320M

<400> 101
 aacacaagcc attggaggat aaggaatttc

30

<210> 102
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO4_P318A+V320L

<400> 102
 attccttatg ctccattggc ttgtgtgtg ctc

33

<210> 103
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO4_P318A+V320L

<400> 103
 aacacaagcc aatggagcat aaggaatttc tgta

34

<210> 104
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO8_F363M

<400> 104
 ttgacaaata tgattggtgg agctaccgat

30

<210> 105
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R cho CyPPO8_F363M

<400> 105
 caccaatcat attgtcaaa aggtgccatc

30

<210> 106
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F cho CyPPO8_F363V

<400> 106
 cttttgacaa atgttattgg tggagctacc

30

<210> 107
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R cho CyPPO8_F363V

<400> 107
 agctccacca ataacatttg tcaaaaggtg

30

<210> 108
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F cho CyPPO8_F363L

<400> 108
 cttttgacaa atcttattgg tggagctacc

30

<210> 109

<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_F363L	
<400>	109	
	agctccacca ataagatttg tcaaaaggtg	30
<210>	110	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_F363C	
<400>	110	
	cttttgacaa attgtattgg tggagctacc	30
<210>	111	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_F363C	
<400>	111	
	agctccacca atacaatttg tcaaaaggtg	30
<210>	112	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_A162C	
<400>	112	
	tctggtgtgt attgtggaga tgttgatcaa	30
<210>	113	
<211>	30	
<212>	ADN	

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi R cho CyPPO8_A162C

<400> 113

atcaacatct ccacaataca caccagaaac

30

<210> 114

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi F cho CyPPO8_A162L

<400> 114

tctgggtgtg atcttggaga tgttgatcaa

30

<210> 115

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi R cho CyPPO8_A162L

<400> 115

atcaacatct ccaagataca caccagaaac

30

<210> 116

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mồi F cho CyPPO8_P306L+V308L

<400> 116

atctcatatc ttccacttgc ttgcgttg

30

<210> 117

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>			
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_P306L+V308L		
<400>	117		
	aacgcaagca agtgggaagat atgagatttc	30	
<210>	118		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_V308M		
<400>	118		
	tcataccctc caatggcttg cgttgctgc	30	
<210>	119		
<211>	30		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_V308M		
<400>	119		
	cacaacgcaa gccattggag gatatgagat	30	
<210>	120		
<211>	36		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_P306A+V308L		
<400>	120		
	atttcctatg cccccctagc ttgtgtgctc ttagcc	36	
<210>	121		
<211>	38		
<212>	ADN		
<213>	Trình tự nhân tạo		
<220>			
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_P306A+V308L		

<400> 121
cacacaagct aggggggcat aggaaatttc gttaagg 38

<210> 122
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi F cho CyPPO8_V160S

<400> 122
gtgtctgggt cttatgcagg ggatgtggat c 31

<210> 123
<211> 32
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi R cho CyPPO8_V160S

<400> 123
cctgcataag acccagacac aaacggactc ac 32

<210> 124
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi F cho CyPPO8_I343T

<400> 124
ttgtacaac ttggagtca acactcttc c 31

<210> 125
<211> 31
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn môi R cho CyPPO8_I343T

<400>	125	
gaactccaag ttgtaccaag agtgcggatt c		31
<210>	126	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi F cho CyPPO8_F363I	
<400>	126	
cttttgacaa atattattgg tggagctacc		30
<210>	127	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi R cho CyPPO8_F363I	
<400>	127	
agctccacca ataattttg tcaaaagggtg		30
<210>	128	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi F cho CyPPO8_F363T	
<400>	128	
cttttgacaa atactattgg tggagctacc		30
<210>	129	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn môi R cho CyPPO8_F363T	
<400>	129	
agctccacca atagtatttg tcaaaagggtg		30

<210> 130
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F cho CyPPO8_R85A

<400> 130
 ggacttcccg ttatgttta ttggagggg 30

<210> 131
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R cho CyPPO8_R85A

<400> 131
 caataaacat aagcgggaag tccgcatca gc 32

<210> 132
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi F cho CyPPO8_I343V

<400> 132
 cttggtacag ttggagttc aacactctt c 31

<210> 133
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mồi R cho CyPPO8_I343V

<400> 133
 aactccaaac tgtaccaaga gtgcgattc 30

<210>	134	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_P84L	
<400>	134	
	aggtttactt aggtatgttt actgggaggg	30
<210>	135	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_P84L	
<400>	135	
	catacctaag taaacctcta tctgcaaaga	30
<210>	136	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_R85C	
<400>	136	
	gacttcctg ttatgtttat tgggagggga aac	33
<210>	137	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_R85C	
<400>	137	
	taaacataac agggaagtcc gcgatcagca aag	33
<210>	138	
<211>	32	

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO8_R85H

<400> 138
 acttcccat tatgtttatt gggaggggaa ac 32

<210> 139
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO8_R85H

<400> 139
 caataaacat aatggggaag tccgcgatca gc 32

<210> 140
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO8_R85L

<400> 140
 acttcccctt tatgtttatt gggaggggaa ac 32

<210> 141
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO8_R85L

<400> 141
 caataaacat aaaggggaag tccgcgatca gc 32

<210> 142
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO8_R85T

<400> 142
 gacttccac ttatgtttat tgggagggga aac 33

<210> 143
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO8_R85T

<400> 143
 ataaacataa gtgggaagtc cgcgatcagc aaag 34

<210> 144
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO8_R85V

<400> 144
 gacttcccg ttatgtttat tgggagggga aac 33

<210> 145
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO8_R85V

<400> 145
 ataaacataa acgggaagtc cgcgatcagc aaag 34

<210> 146
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi F cho CyPPO8_F156A

<400> 146

gtgagtcagg ctgtgtctgg ggtttatgca

30

<210> 147

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi R cho CyPPO8_F156A

<400> 147

cccagacaca gccggactca ctaaccgttg

30

<210> 148

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi F cho CyPPO8_V160C

<400> 148

ccgtttgtgt ctgggtgcta tgcaggggat gtg

33

<210> 149

<211> 33

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi R cho CyPPO8_V160C

<400> 149

cacatcccct gcatagcacc cagacacaaa cgg

33

<210> 150

<211> 31

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi F cho CyPPO8_Q179G

<400>	150	
tccgccagtc	cggttaactcg	tccaaatgca g
		31
<210>	151	
<211>	31	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_Q179G	
<400>	151	
cgagttaccg	gactggcgga	tgtggcggt g
		31
<210>	152	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_F327V	
<400>	152	
gttttccct	caaaggagtg	ggtaatctta accctc
		36
<210>	153	
<211>	36	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi R cho CyPPO8_F327V	
<400>	153	
gagggttaag	attaccact	ccttgagg gaaaac
		36
<210>	154	
<211>	30	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi F cho CyPPO8_L330T	
<400>	154	

tttgtaata ctaaccctcg cagtaagga

30

<210> 155
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO8_L330T

<400> 155
 gcgagggtta gtattaccaa atcctttgag

30

<210> 156
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi F cho CyPPO8_F363M+N362S

<400> 156
 cttttgacat caatgattgg tggagctacc

30

<210> 157
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi R cho CyPPO8_F363M+N362S

<400> 157
 ccaatcattg atgtcaaaag gtgccatcct

30

<210> 158
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn môi xuôi cho CyPPO8 F363M đoạn dò

<400> 158
 gcgttaacgg gtgcattagg c

21

<210>	159	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	Đoạn mồi ngược cho CyPPO8 F363M đoạn dò	
<400>	159	
tggaagagt gttgaactcc		20
<210>	160	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mồi TOPO-cTP_F	
<400>	160	
cacatggag ttatctcttc		20
<210>	161	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mồi TOPO-CyPPO2_R	
<400>	161	
tcagatgat cgagtatctg		20
<210>	162	
<211>	20	
<212>	ADN	
<213>	Trình tự nhân tạo	
<220>		
<223>	đoạn mồi TOPO-CyPPO8_R	
<400>	162	
ttaacccaaa taatctaaca		20
<210>	163	

<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn nối xuôi cho đoạn dò bar

<400> 163
ttccgtaccg agccgcagga

20

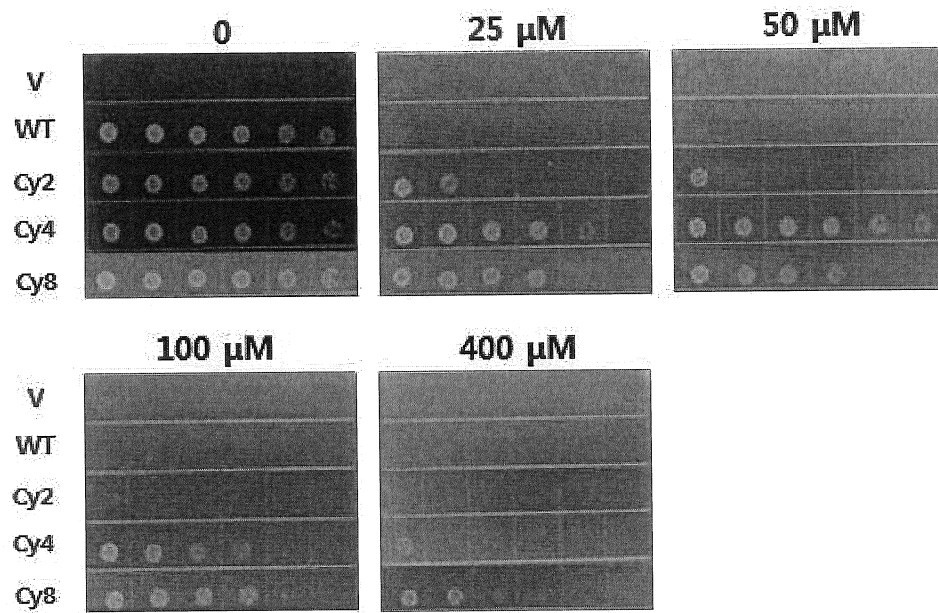
<210> 164
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn nối ngược cho đoạn dò bar

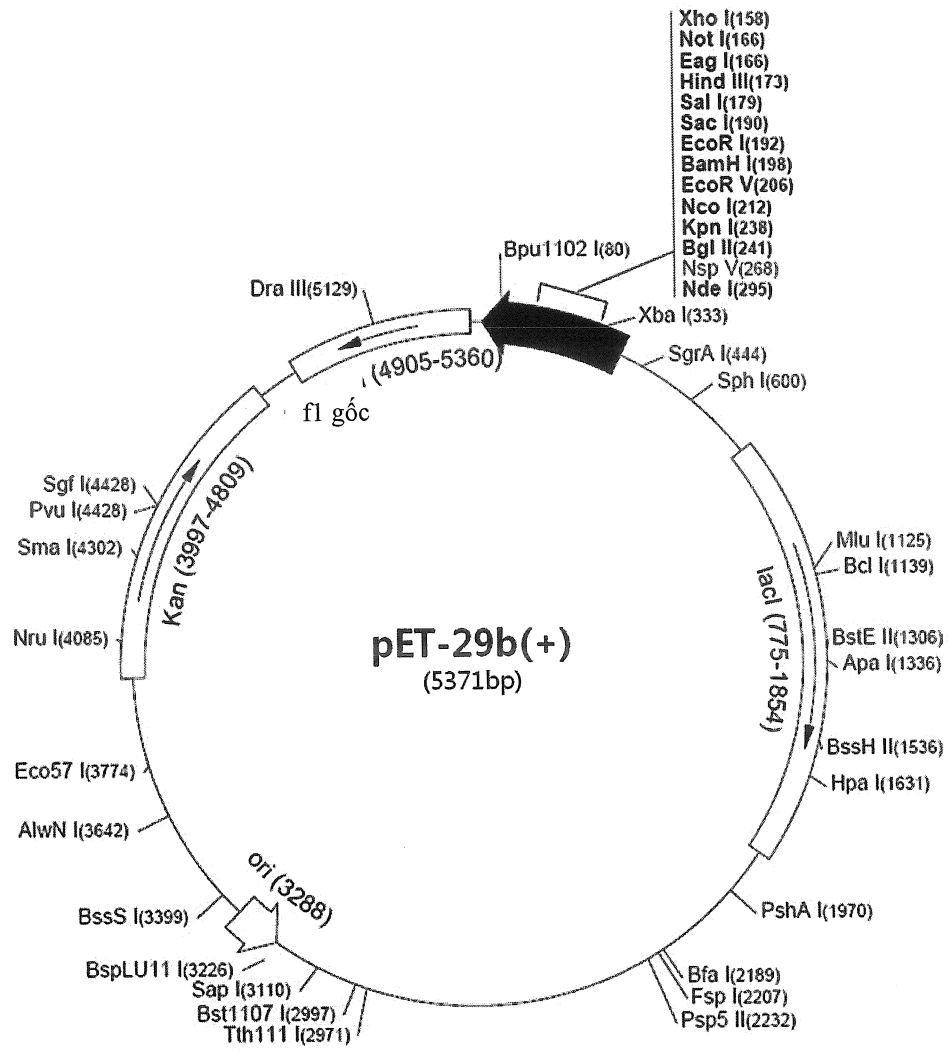
<400> 164
cgttgggcag cccgatgaca

20

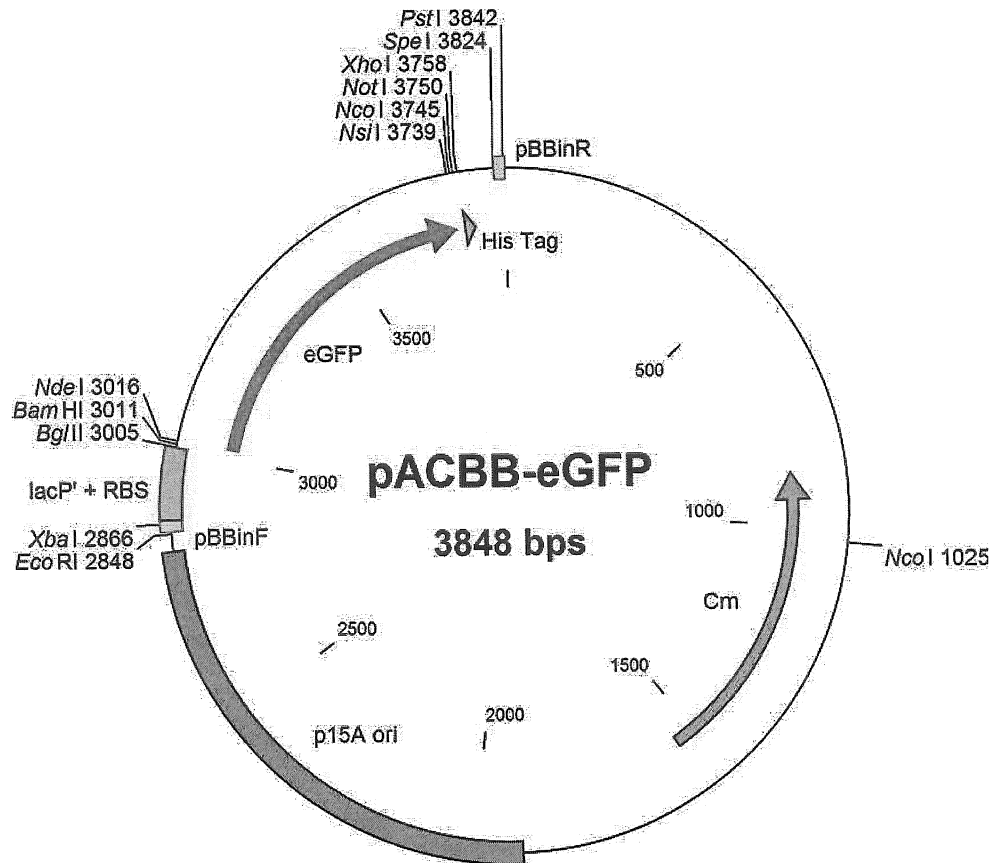
【Fig. 1】



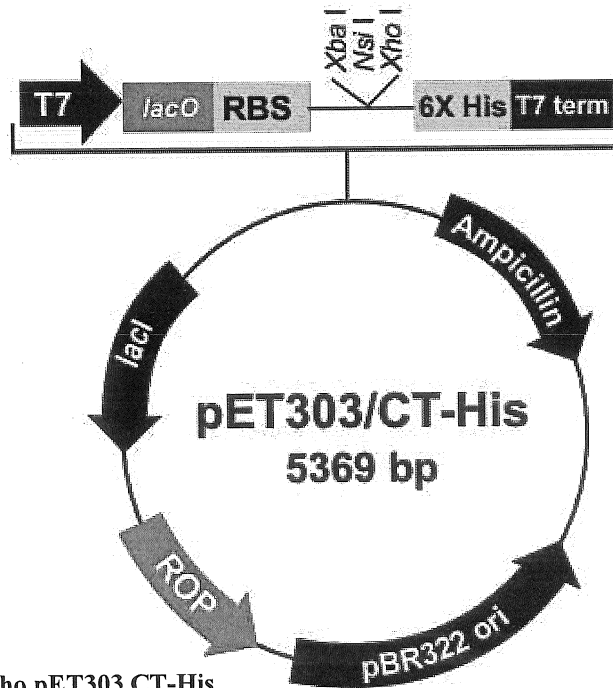
【Fig. 2】



【Fig. 3】



【Fig. 4】



Diễn giải cho pET303 CT-His

5369 nucleotit

Đoạn khởi đầu T7: bazơ 20-36

Vị trí dò đoạn khởi đầu T7: bazơ 20-39

Đoạn vận hành lac (*lacO*): bazơ 39-63

Vị trí liên kết riboxom (RBS): bazơ 95-100

Thẻ 6X His: bazơ 119-136

Vị trí dò đoạn ngược T7: bazơ 186-206

Vùng kết thúc phiên mã T7: bazơ 147-277

F1 gốc: bazơ 287-742

Đoạn khởi đầu *bla*: bazơ 775-879

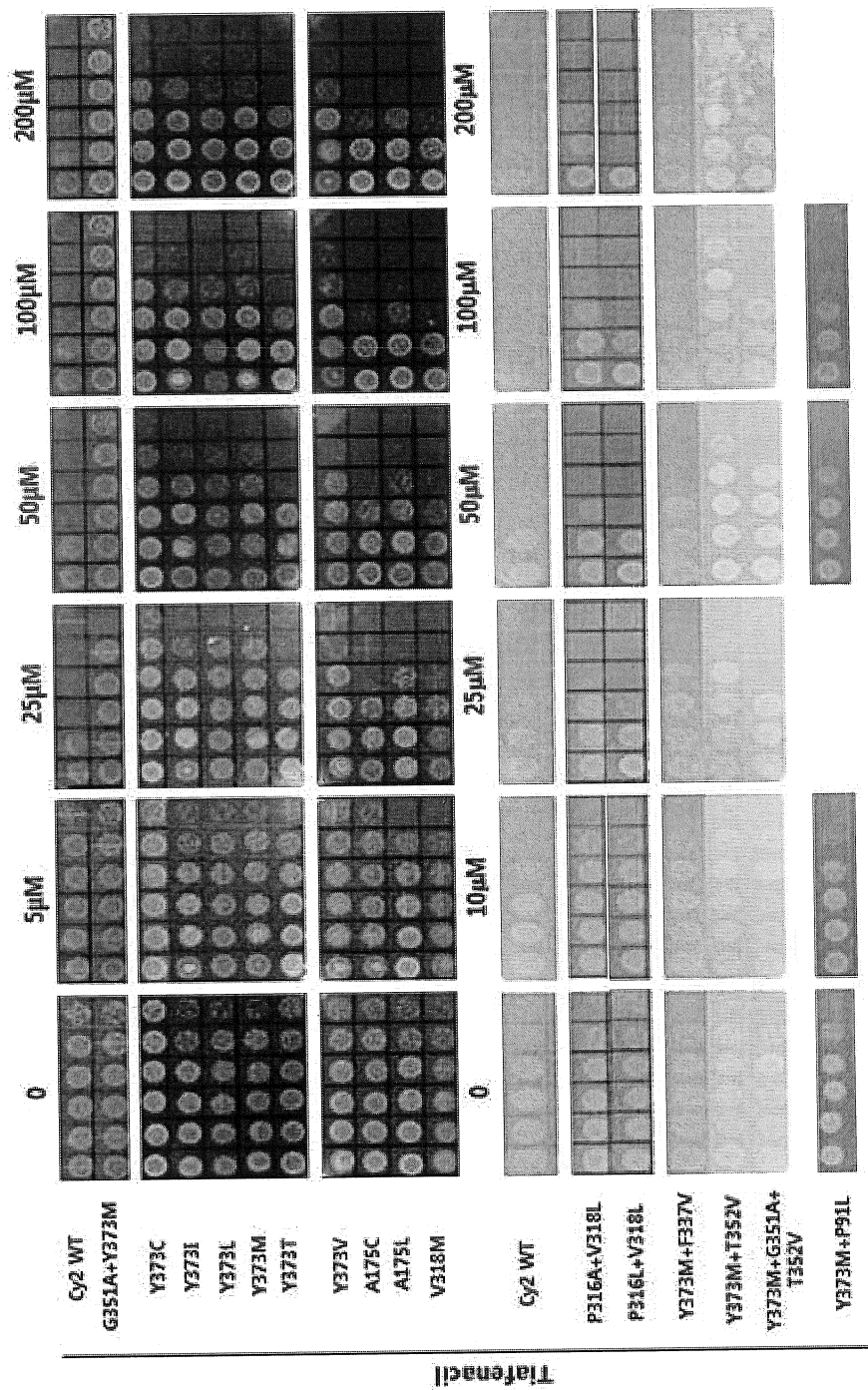
Gen kháng ampicillin (*bla*): bazơ 874-1734

pBR322 gốc: bazơ 1945-2678 (c)

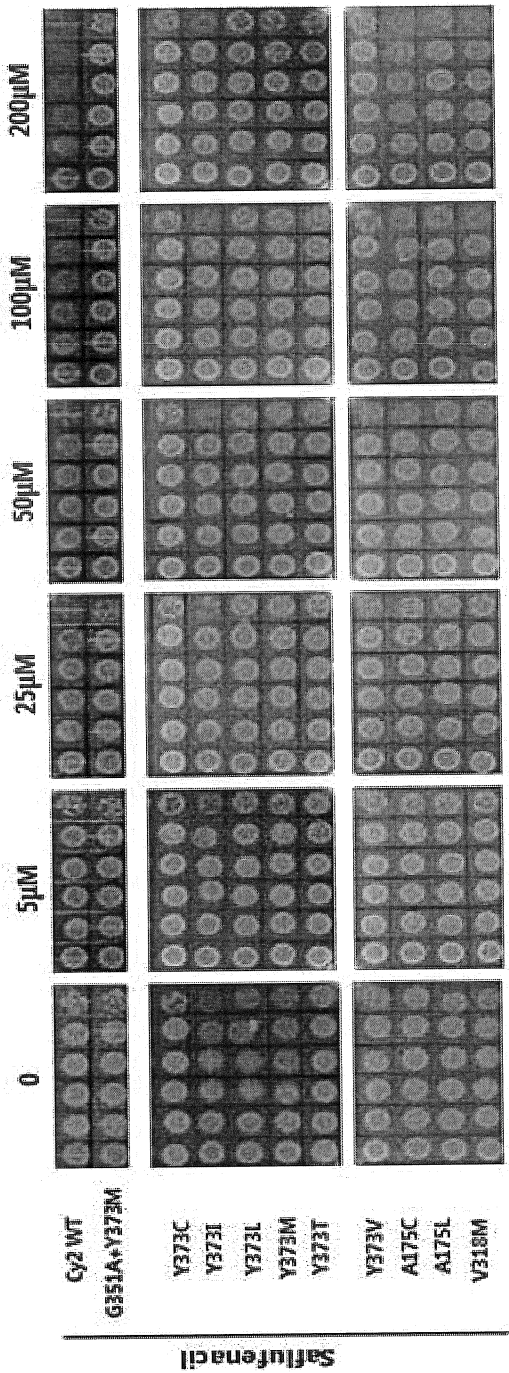
ROP ORF: bazơ 2920-3011 (c)

lacI ORF: bazơ 3914-5032 (c)

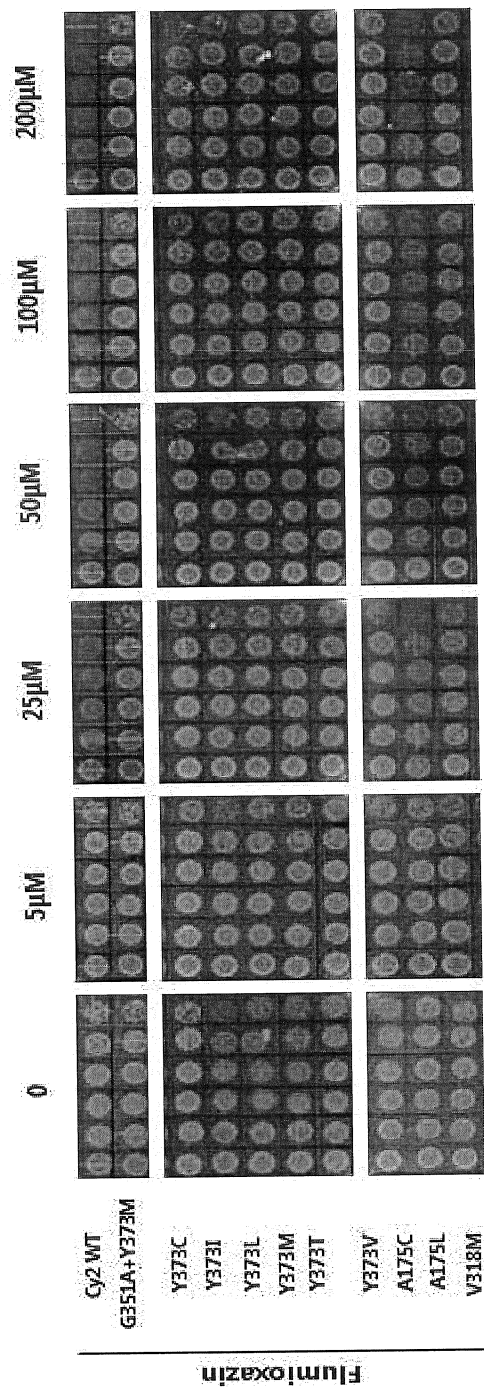
[Fig. 5]



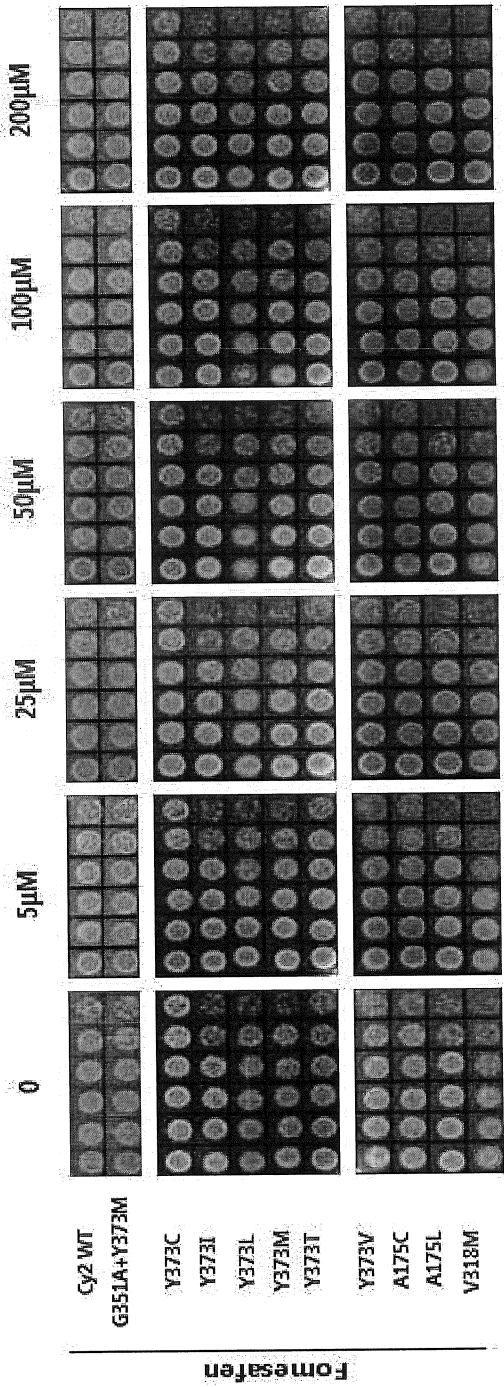
[Fig. 6]



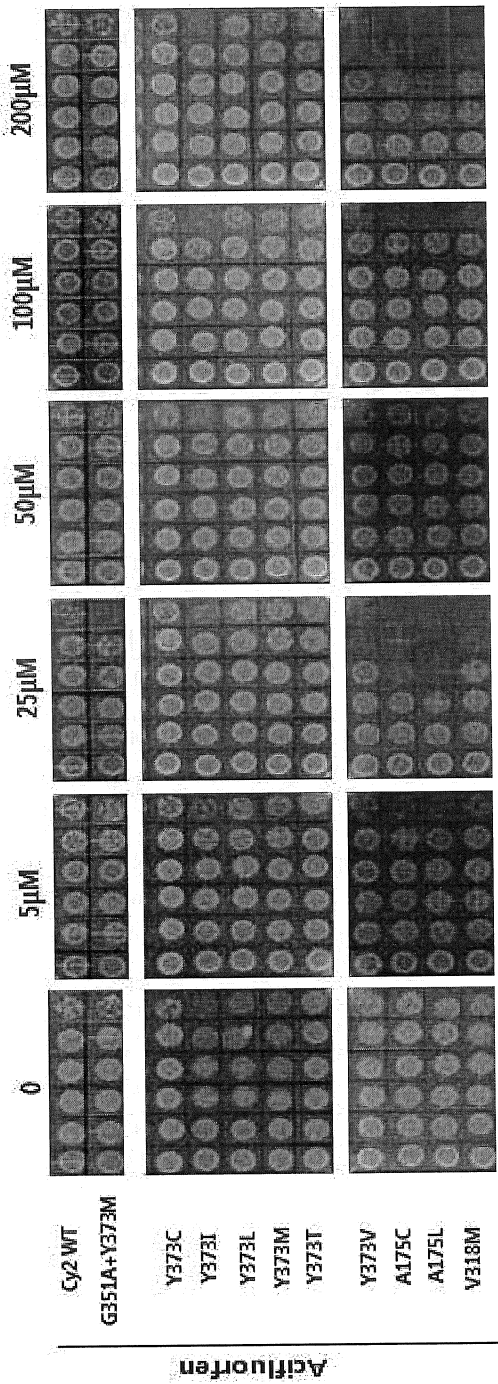
【Fig. 7】



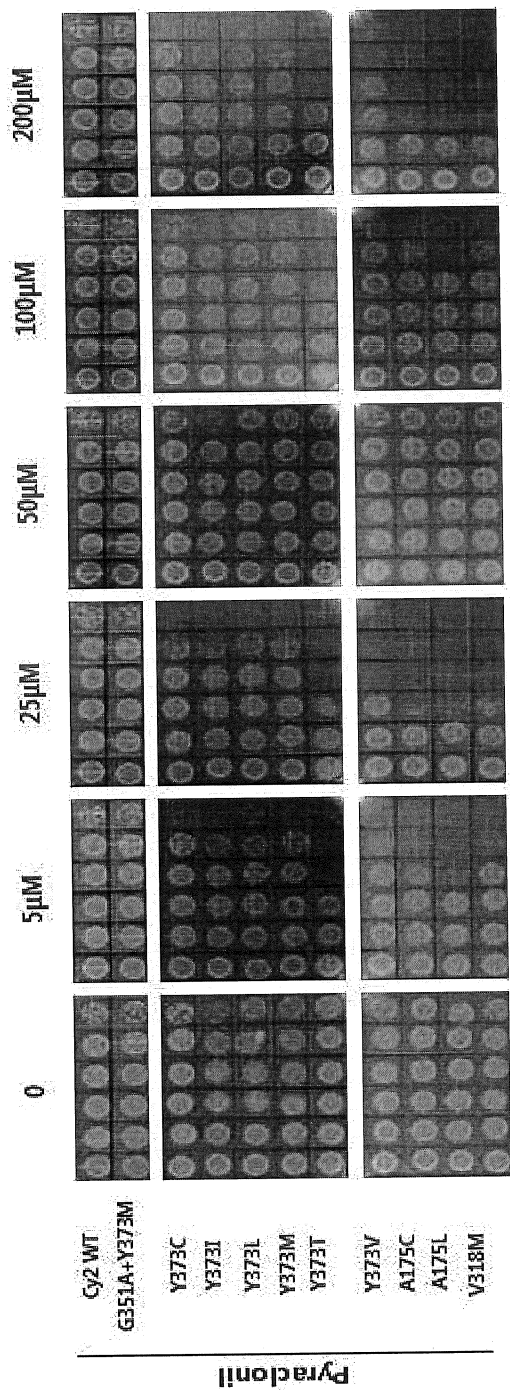
【Fig. 8】



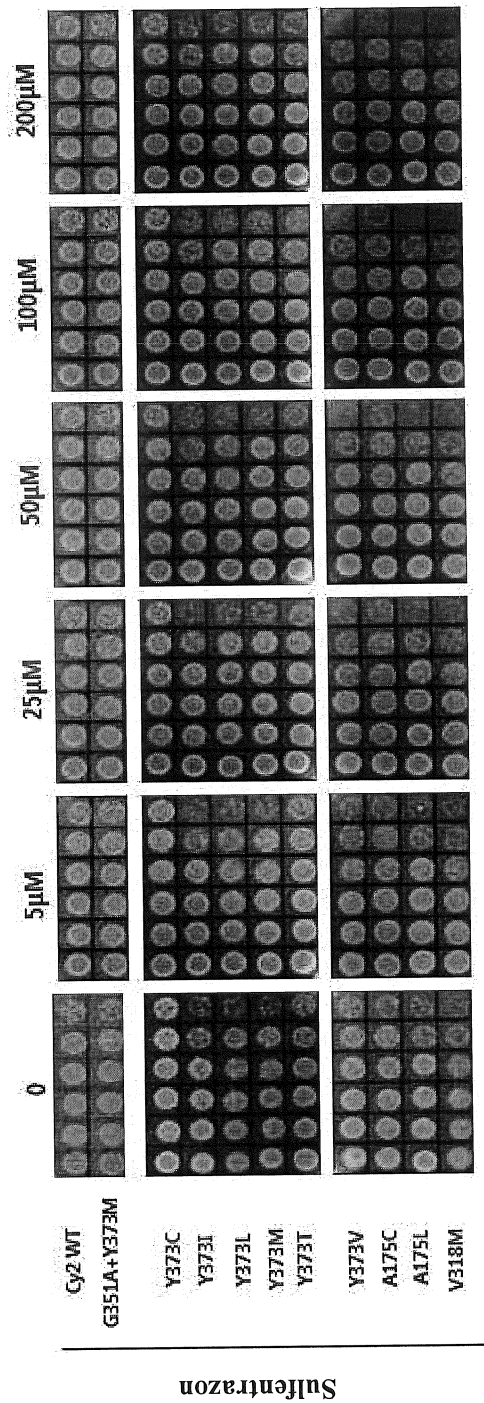
[Fig. 9]



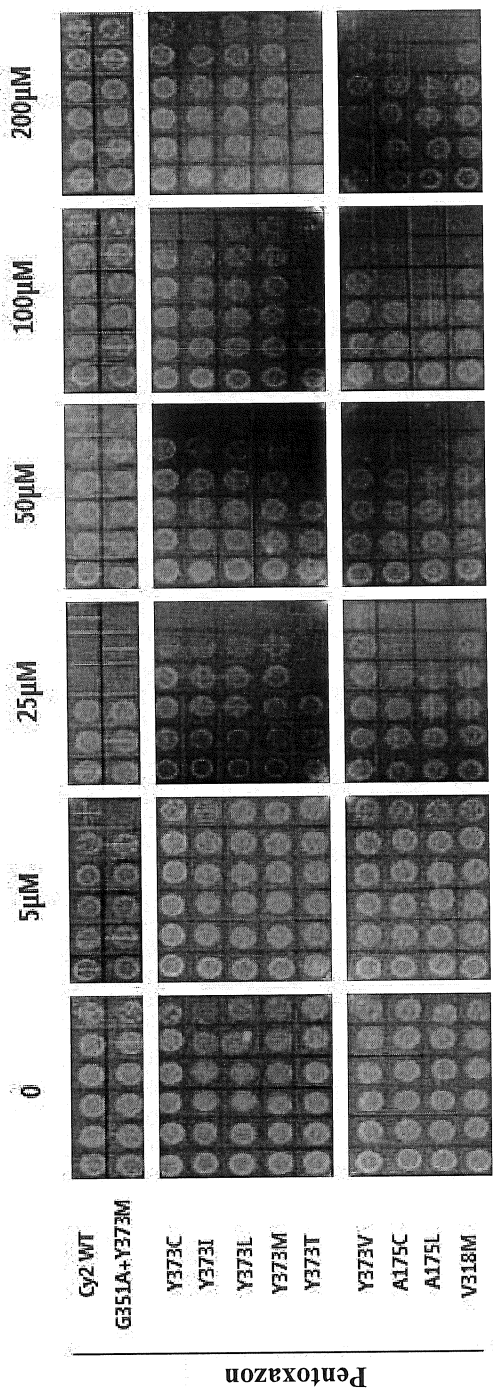
【Fig. 10】



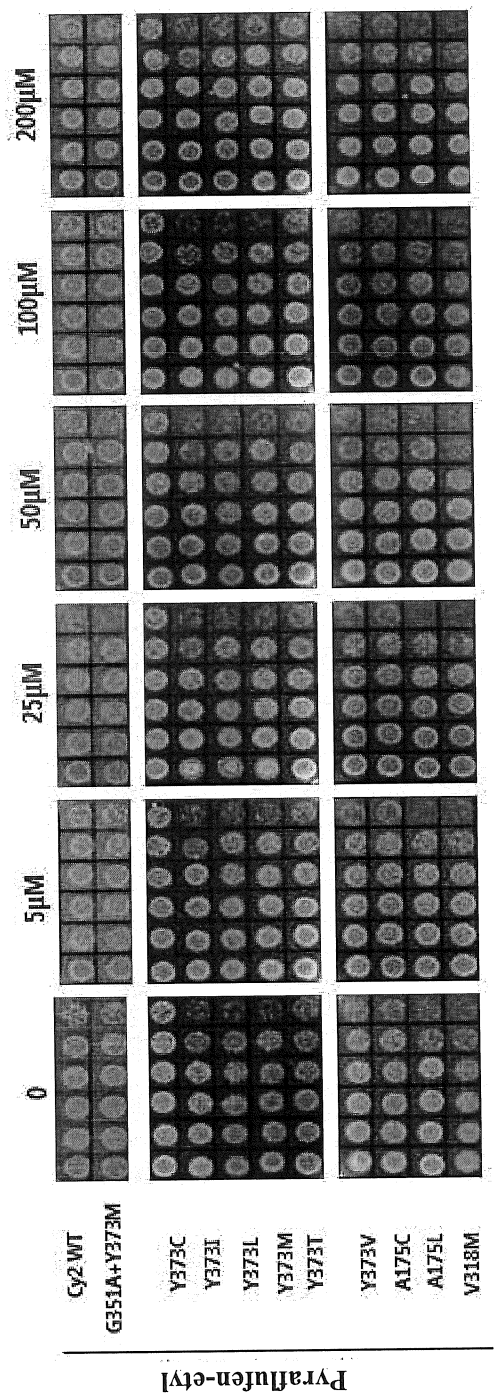
【Fig. 11】



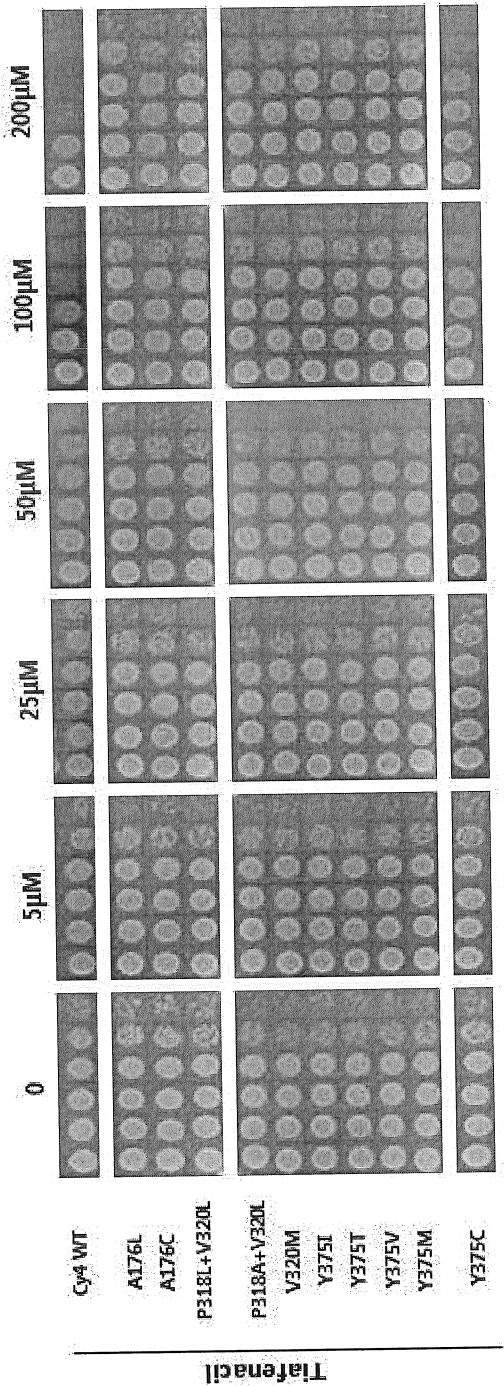
【Fig. 12】



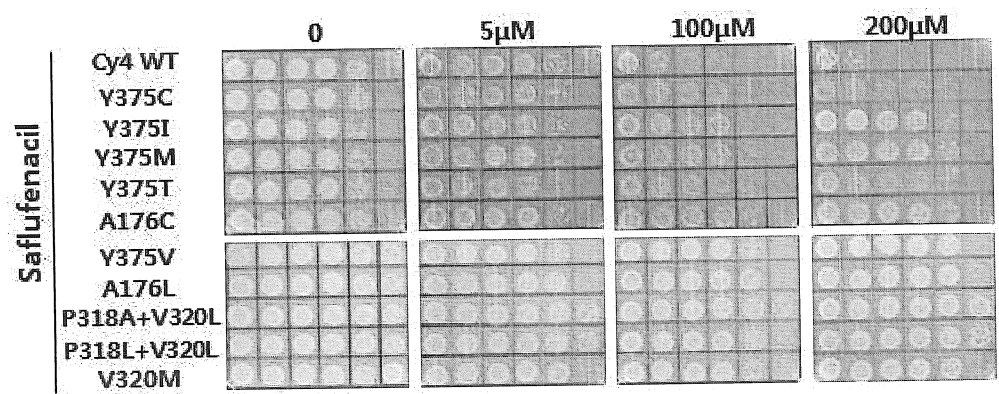
【Fig. 13】



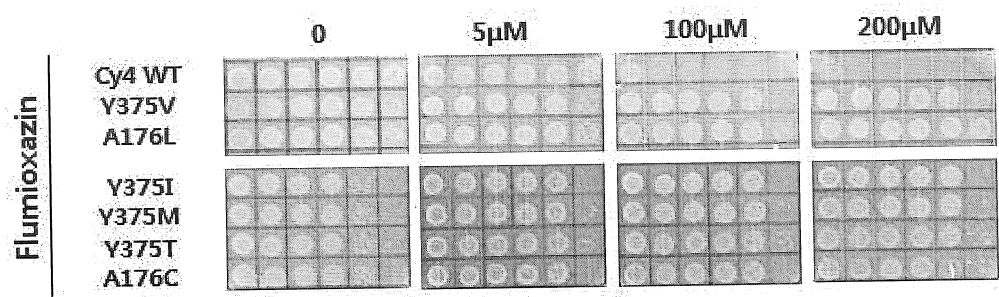
【Fig. 14】



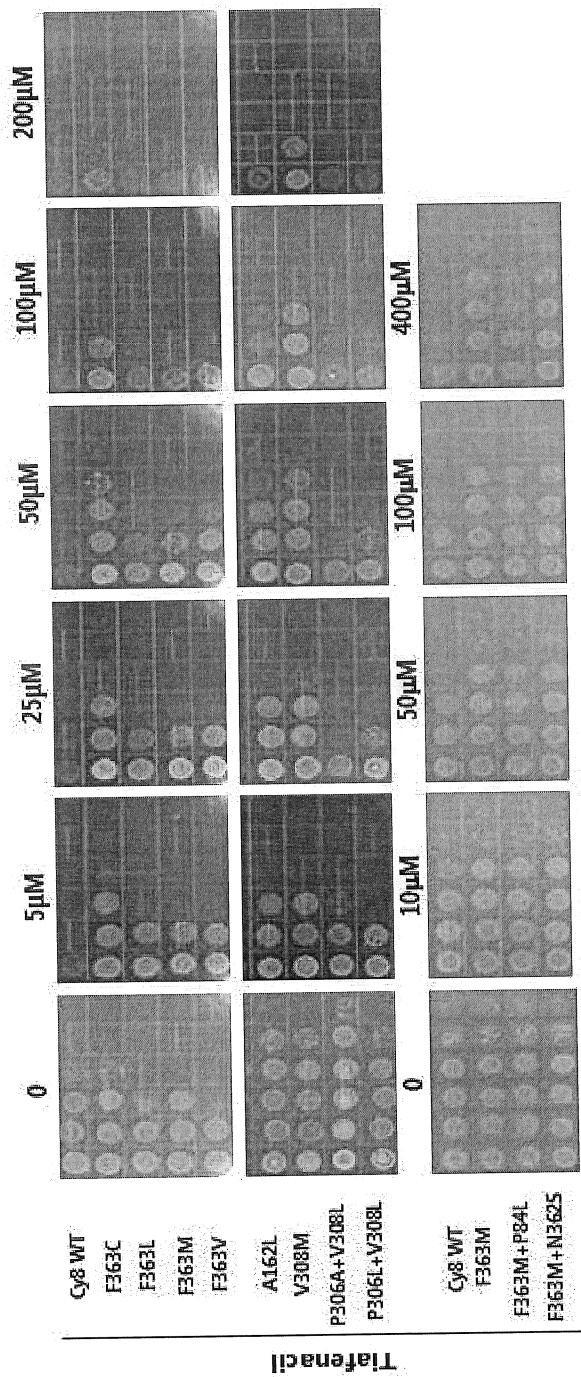
【Fig. 15】



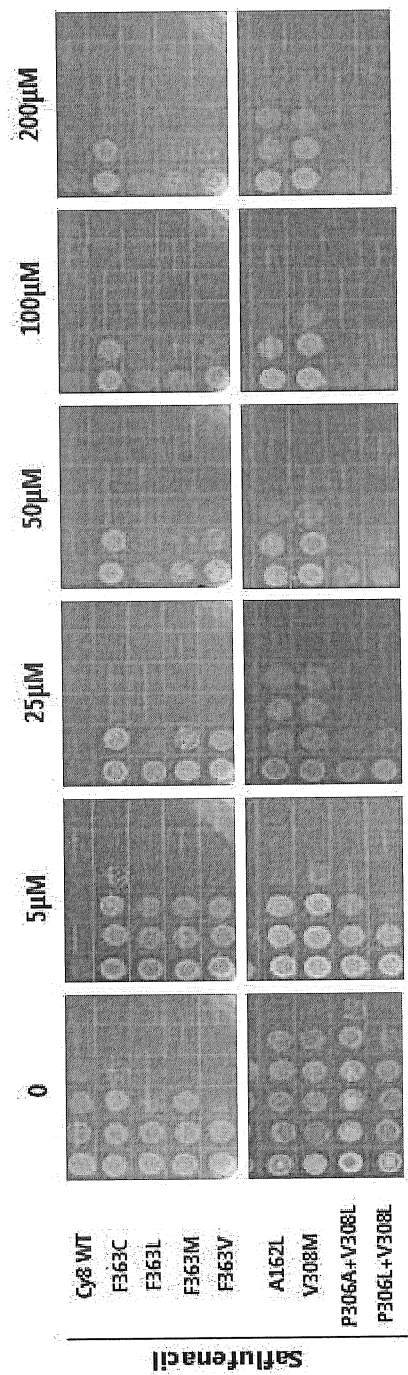
【Fig. 16】



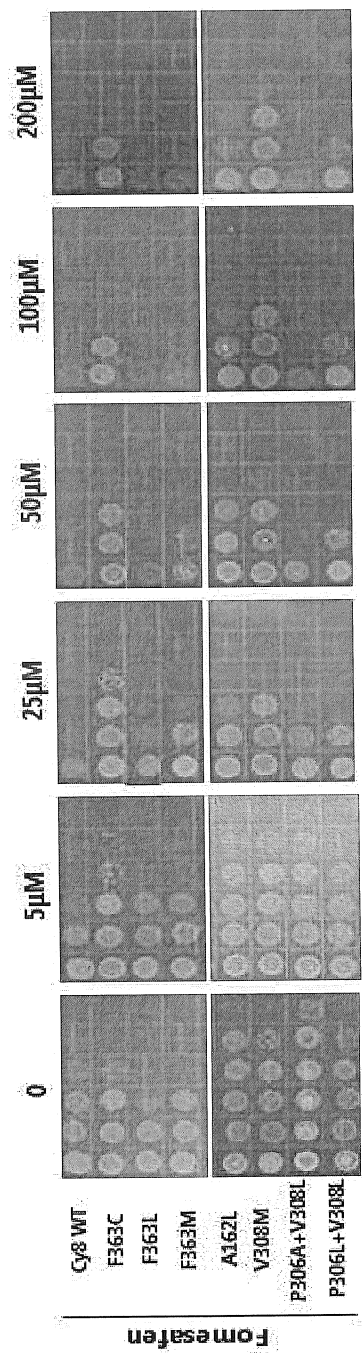
【Fig. 17】



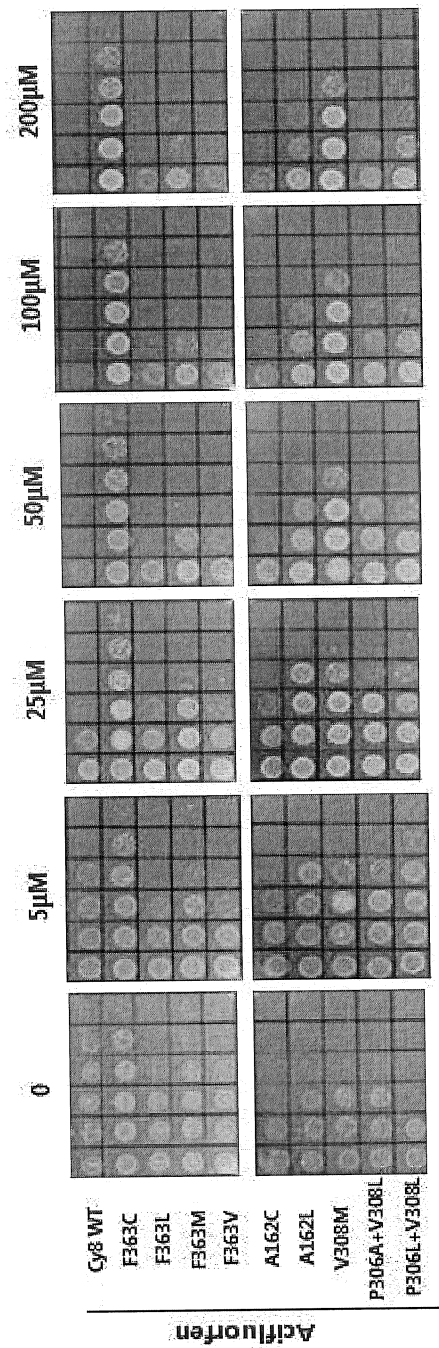
【Fig. 18】



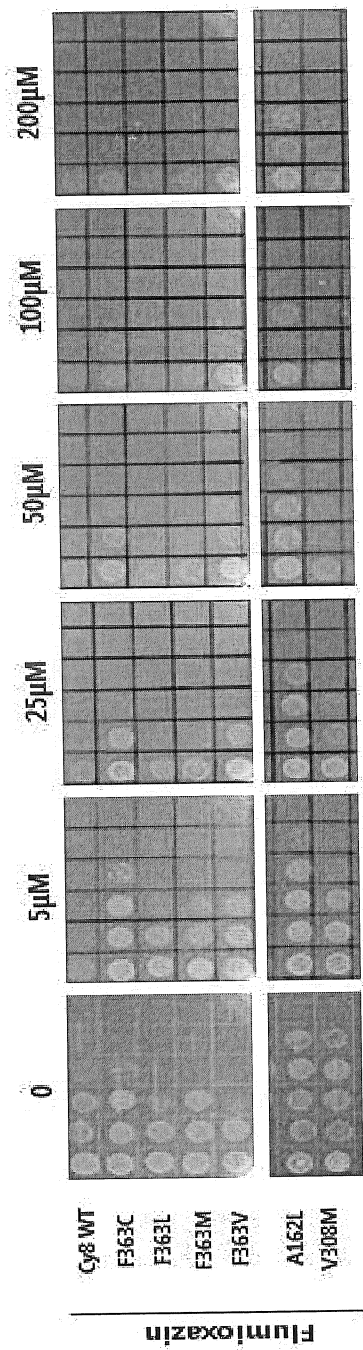
【Fig. 19】



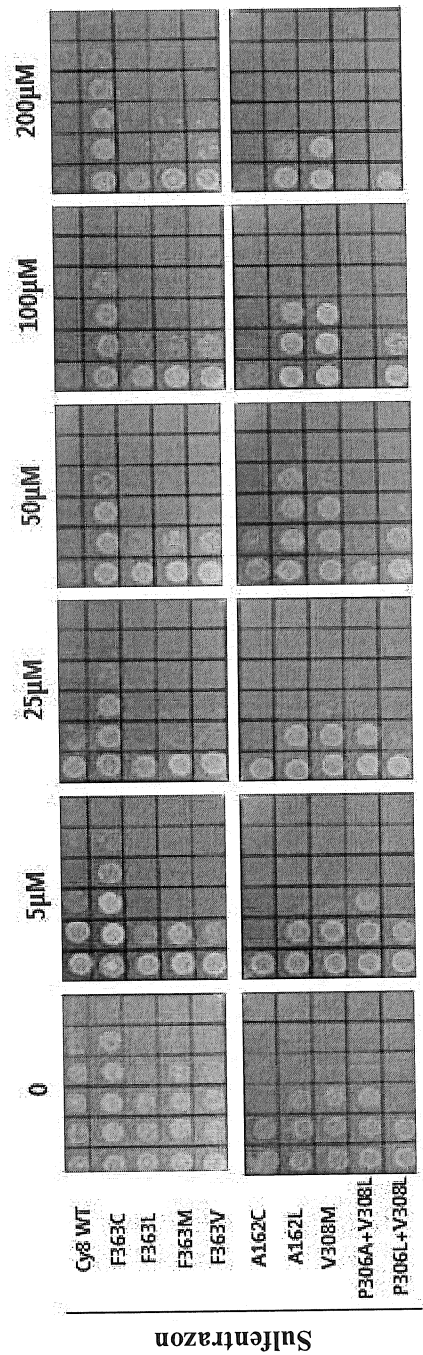
【Fig. 20】



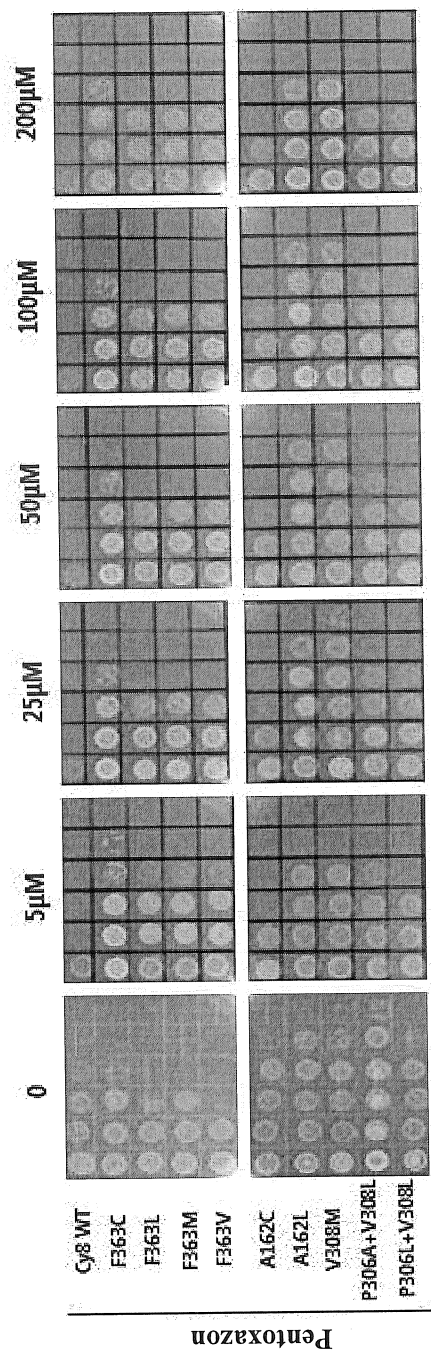
【Fig. 21】



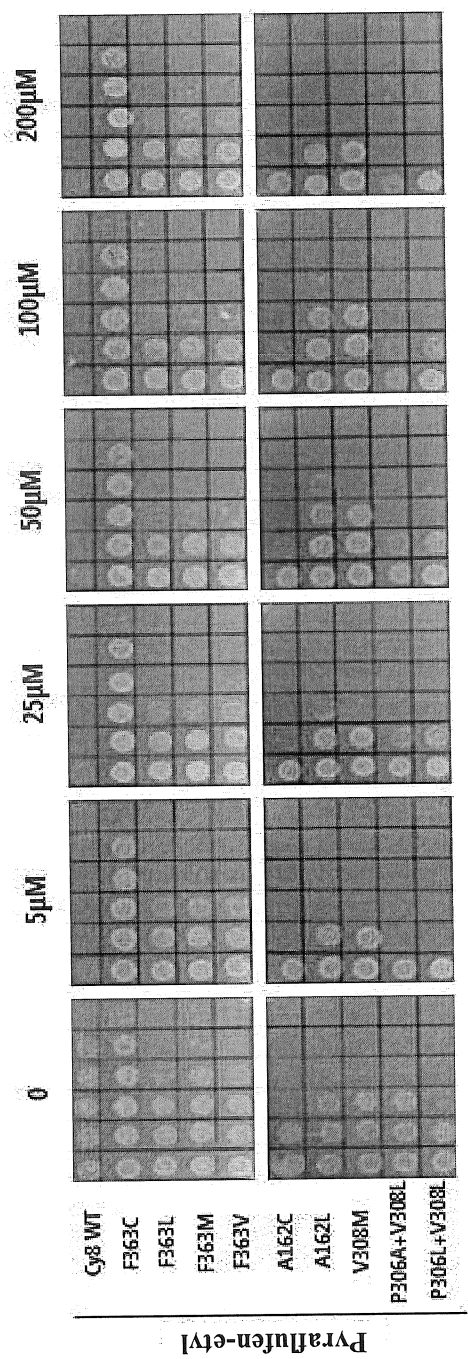
【Fig. 22】



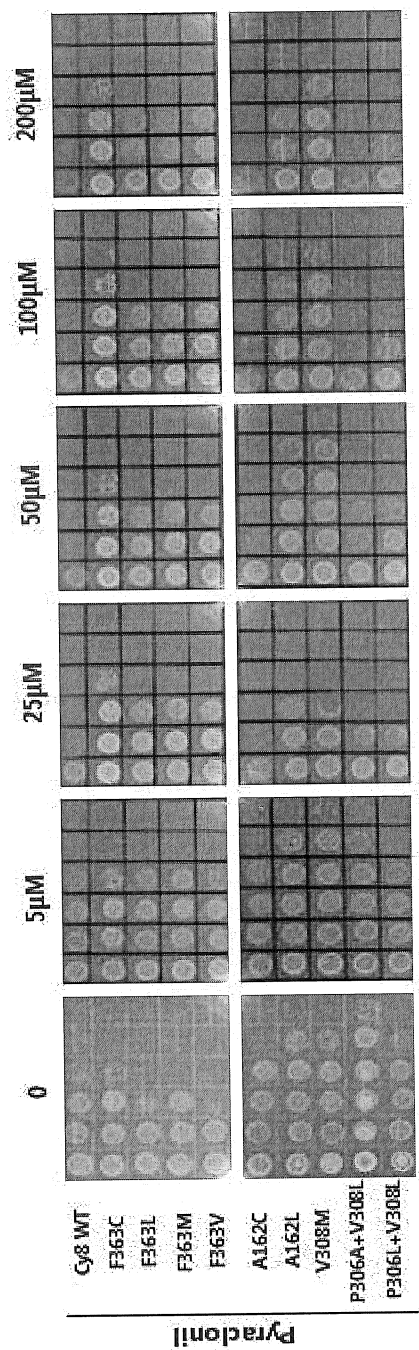
【Fig. 23】



【Fig. 24】

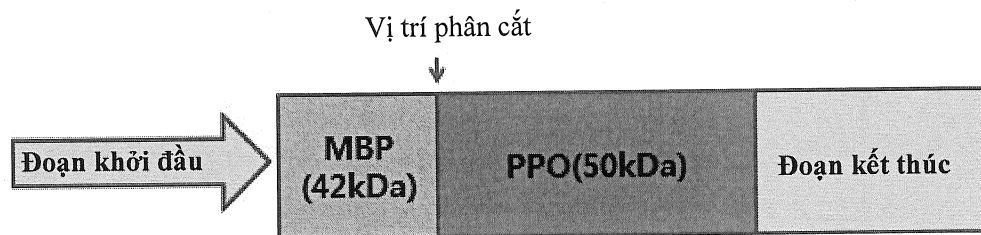


【Fig. 25】

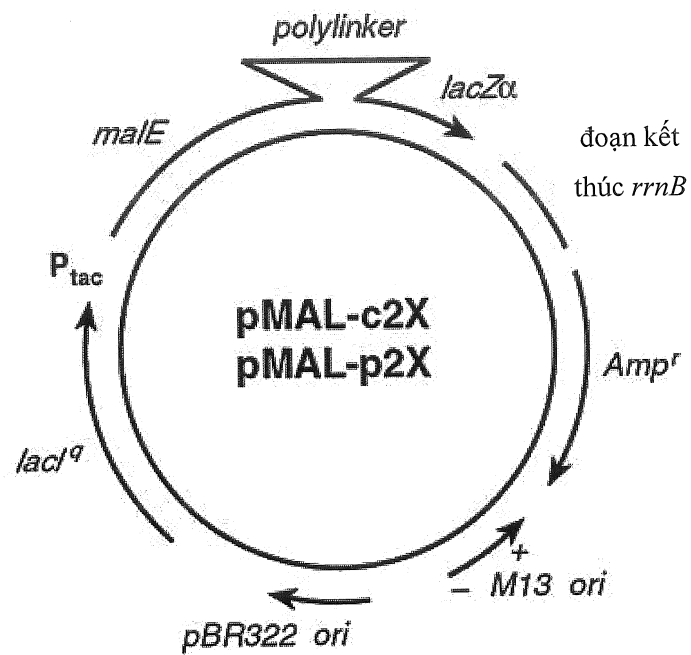


【Fig. 26】

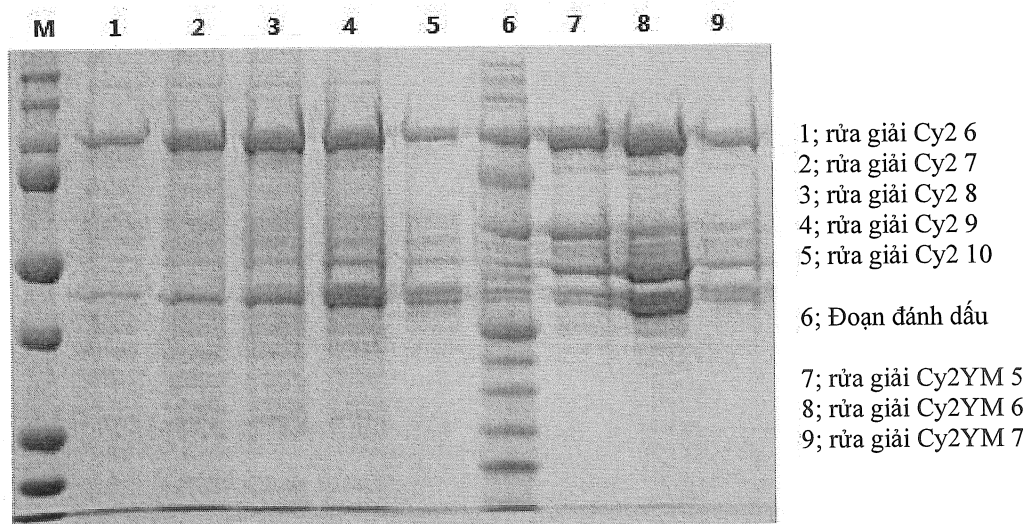
Vector để dung hợp protein của PPD và MMP (Protein liên kết maltoza)



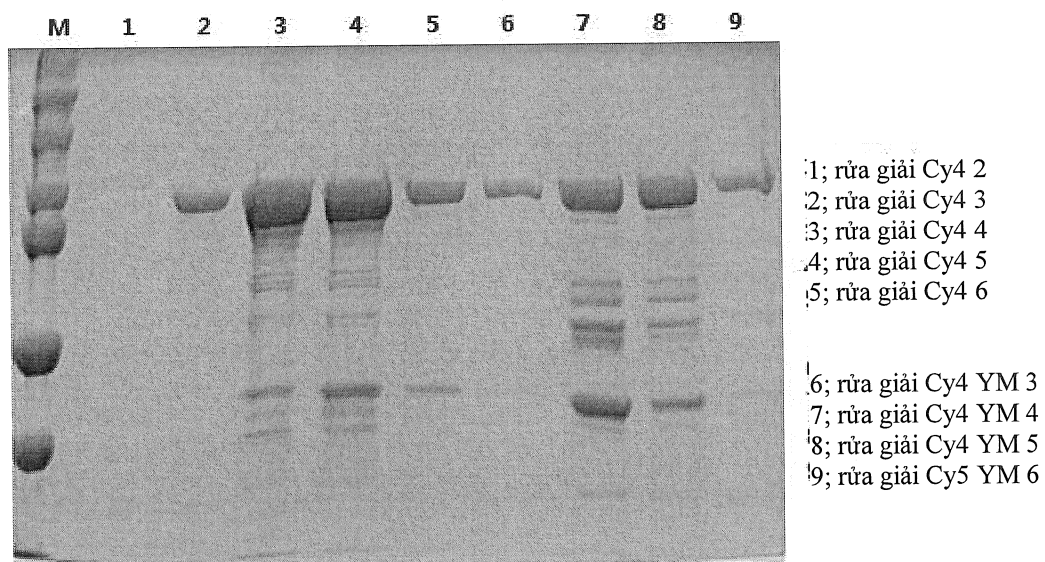
【Fig. 27】



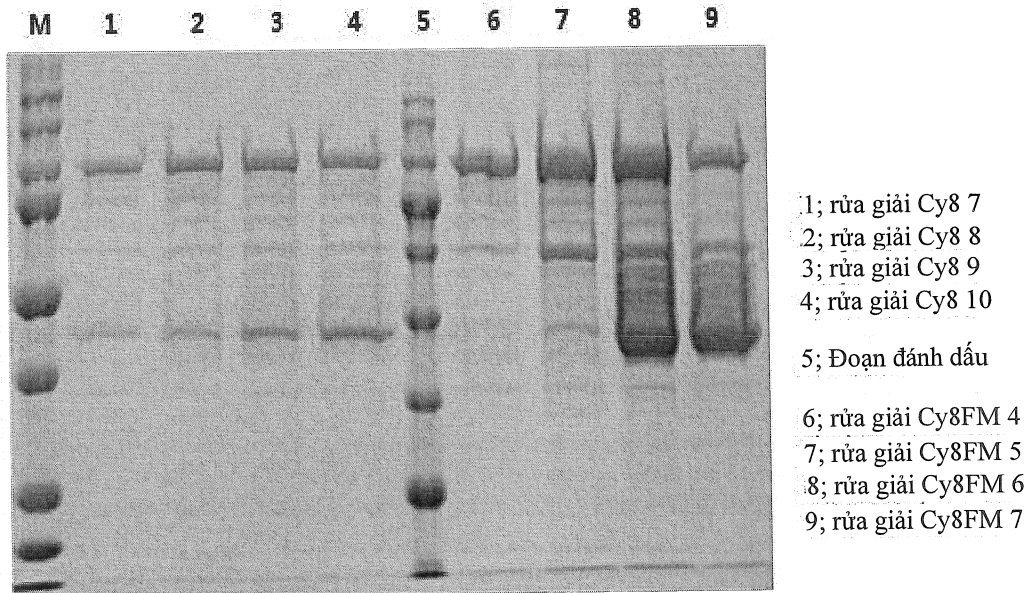
【Fig. 28】



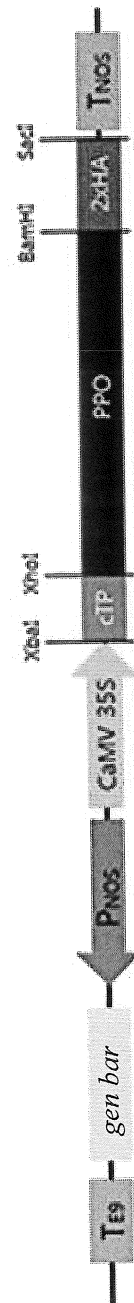
【Fig. 29】



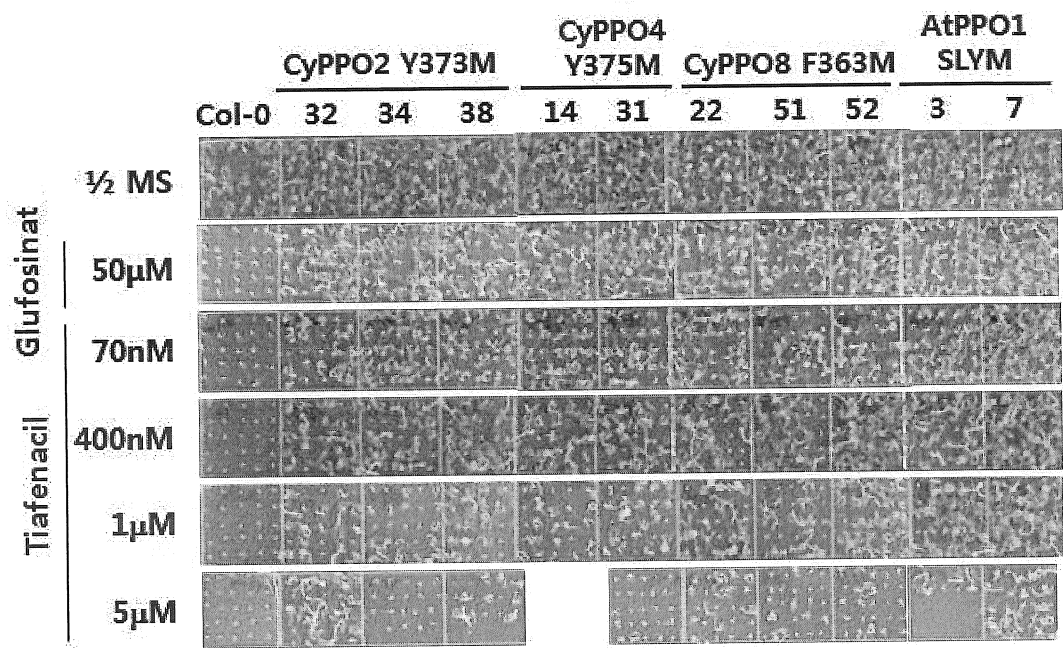
【Fig. 30】



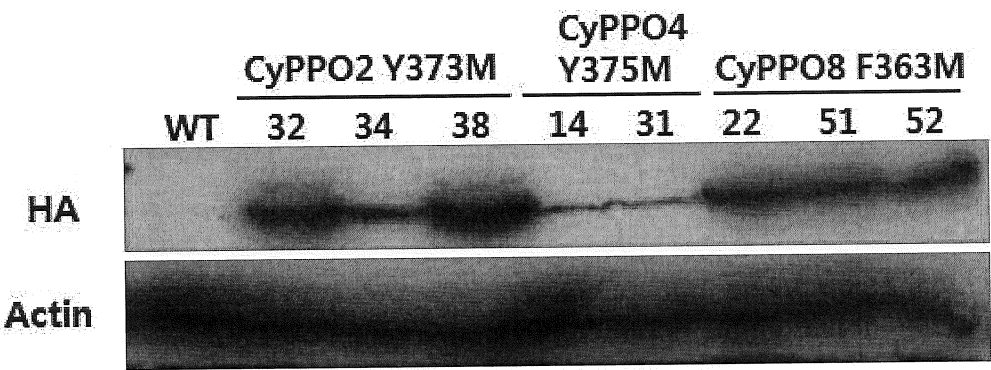
【Fig. 31】



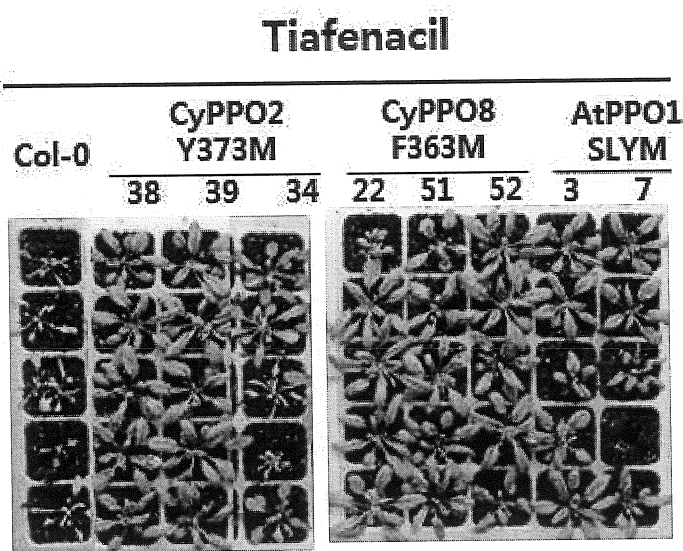
【Fig. 32】



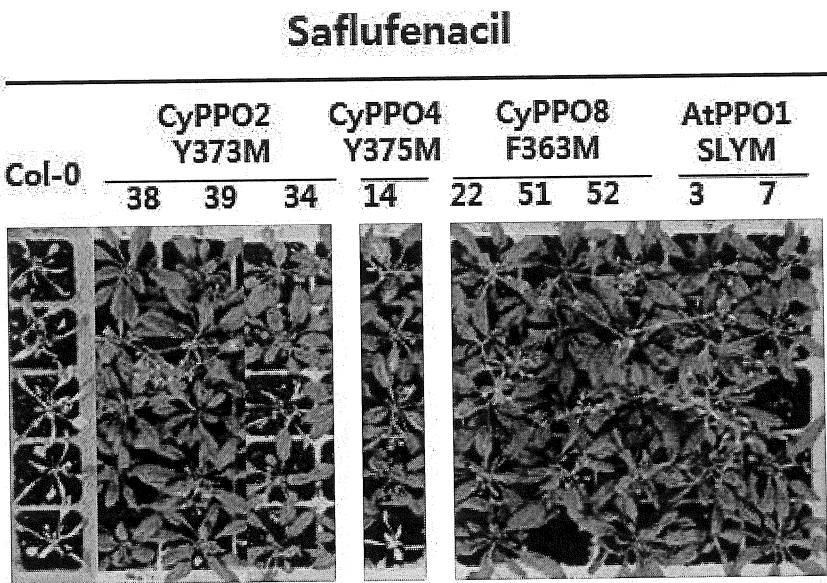
【Fig. 33】



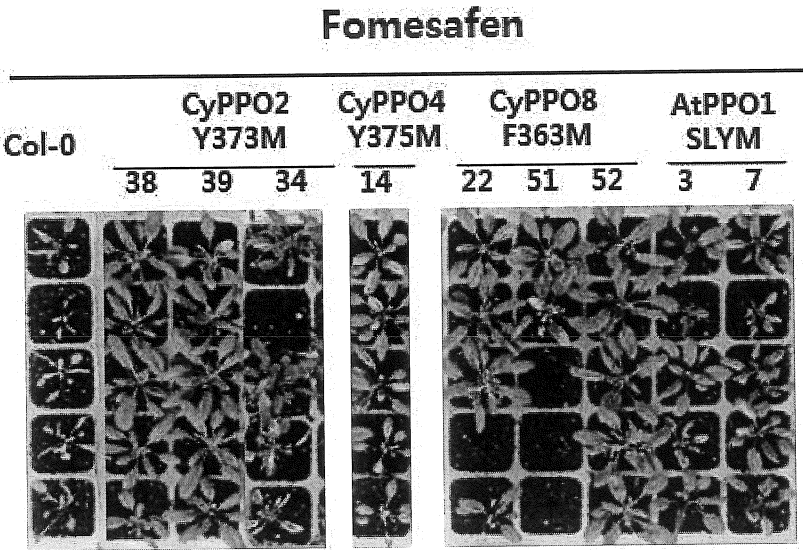
【Fig. 34】



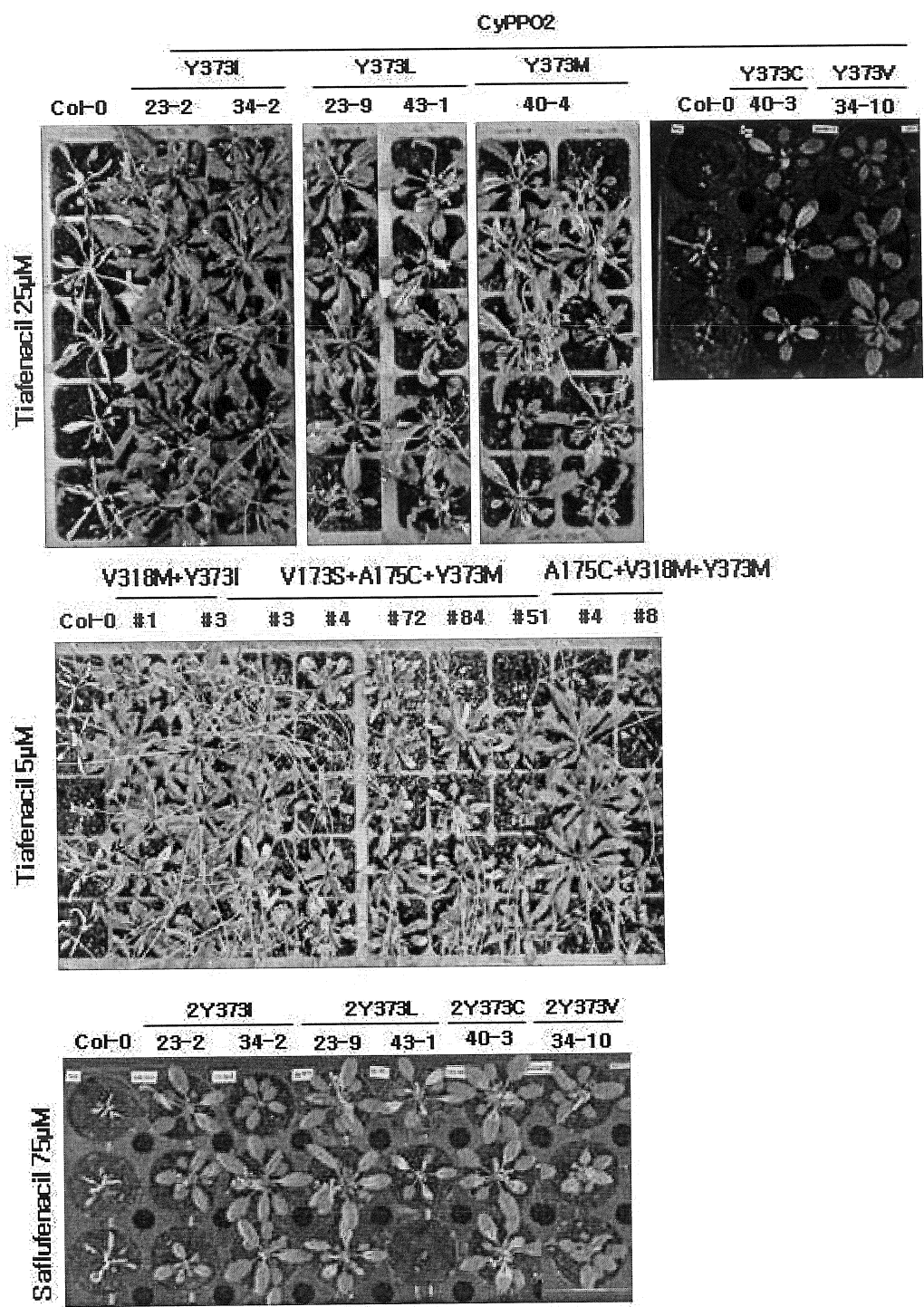
【Fig. 35】



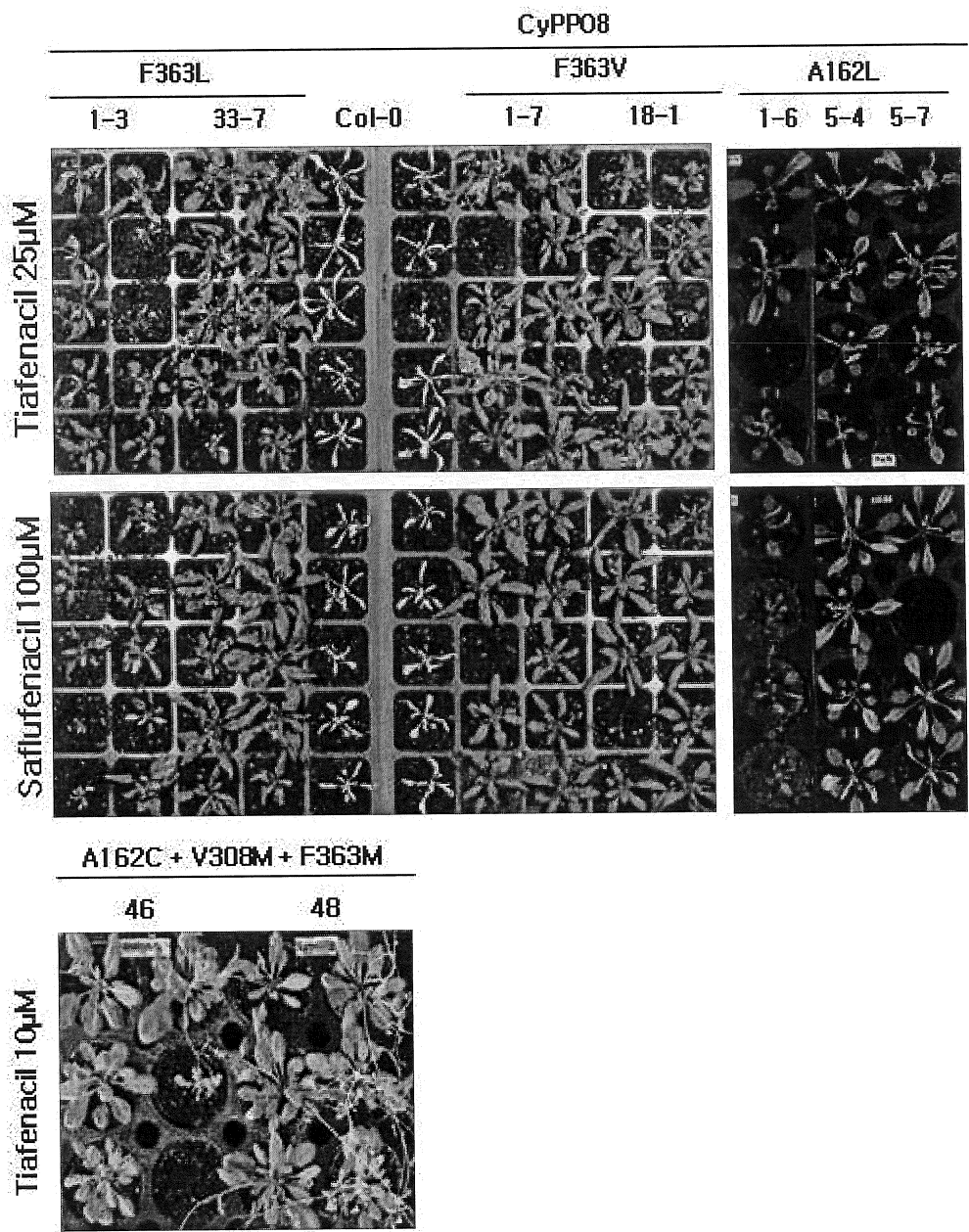
【Fig. 36】



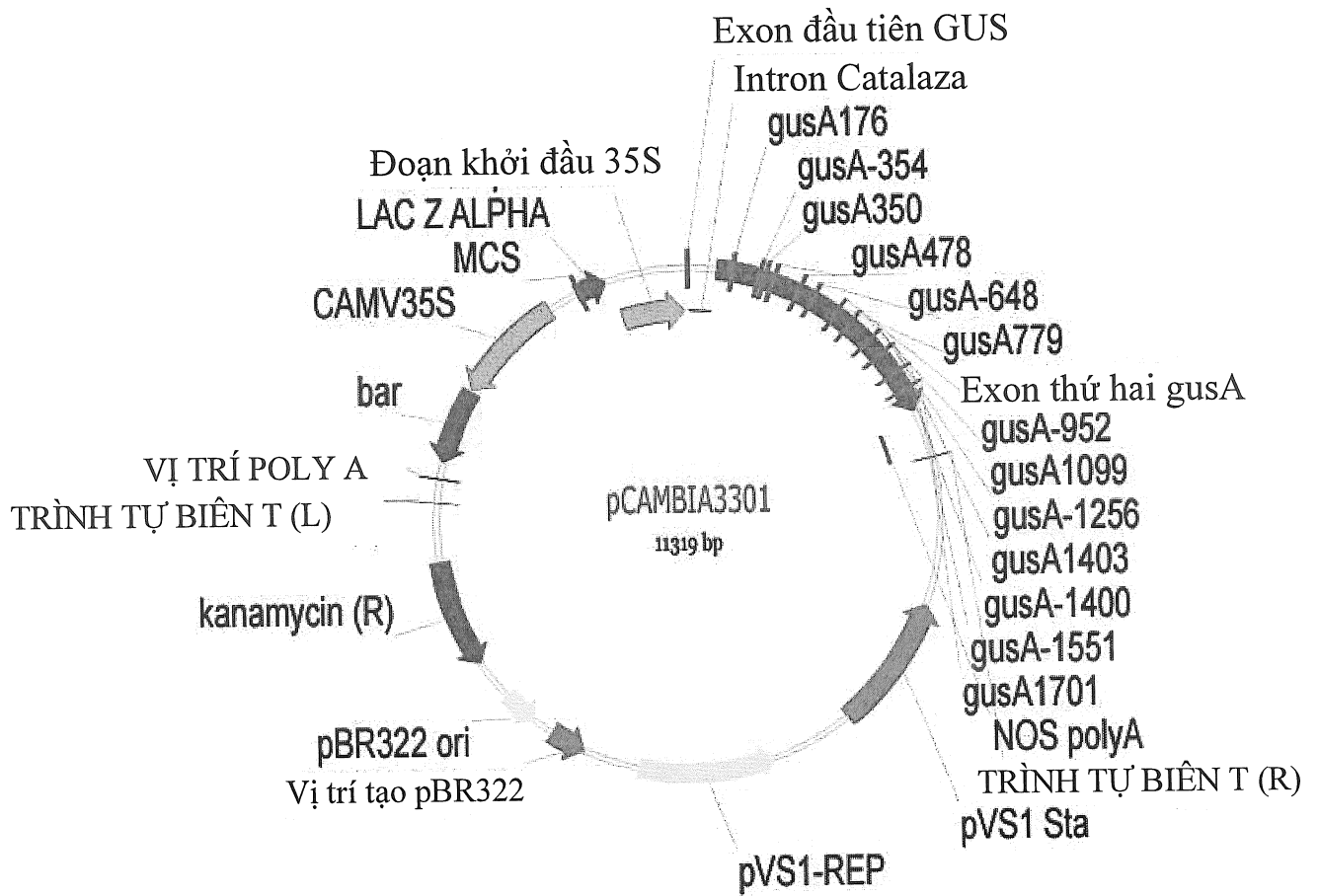
【Fig. 37】



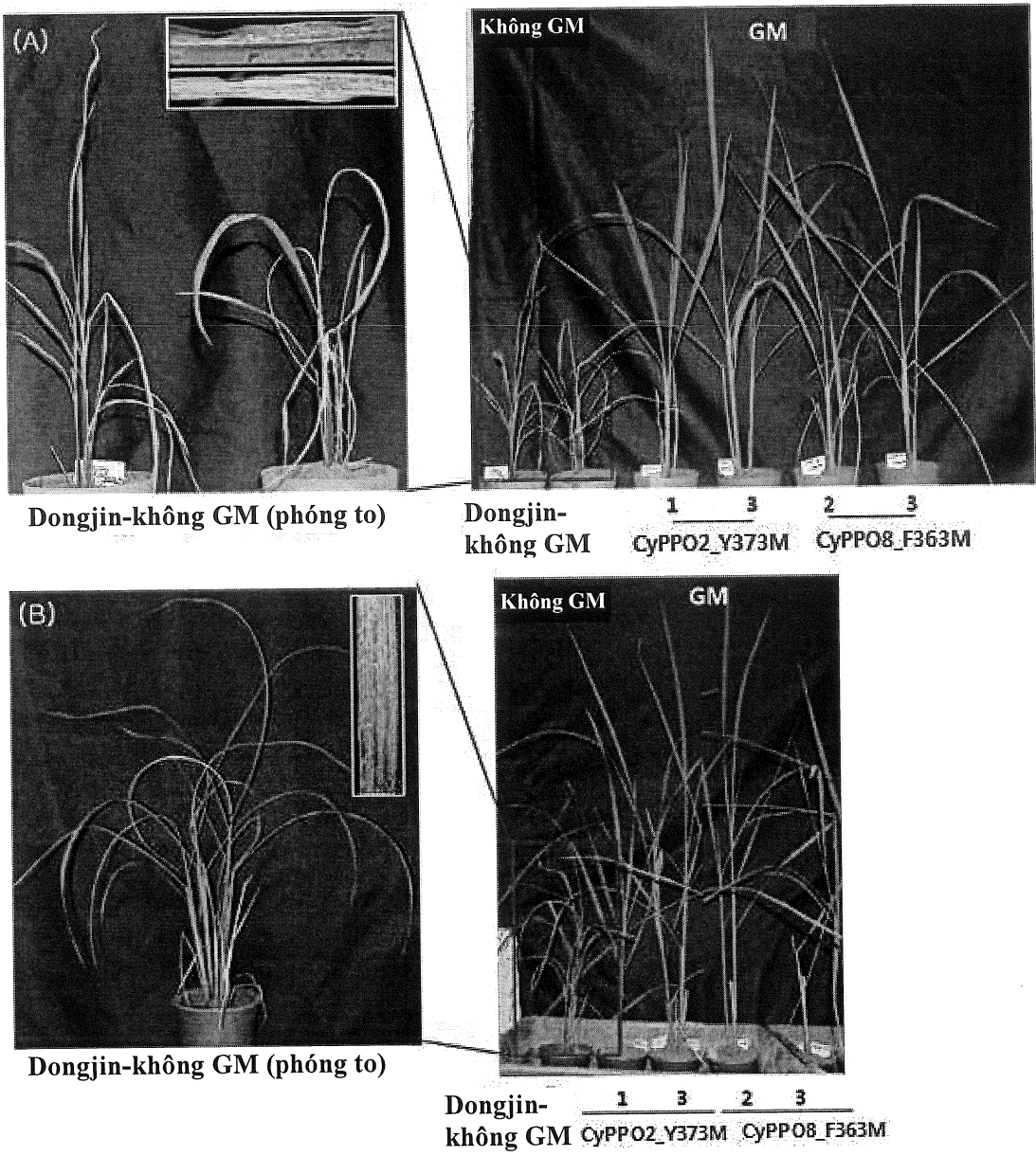
【Fig. 38】

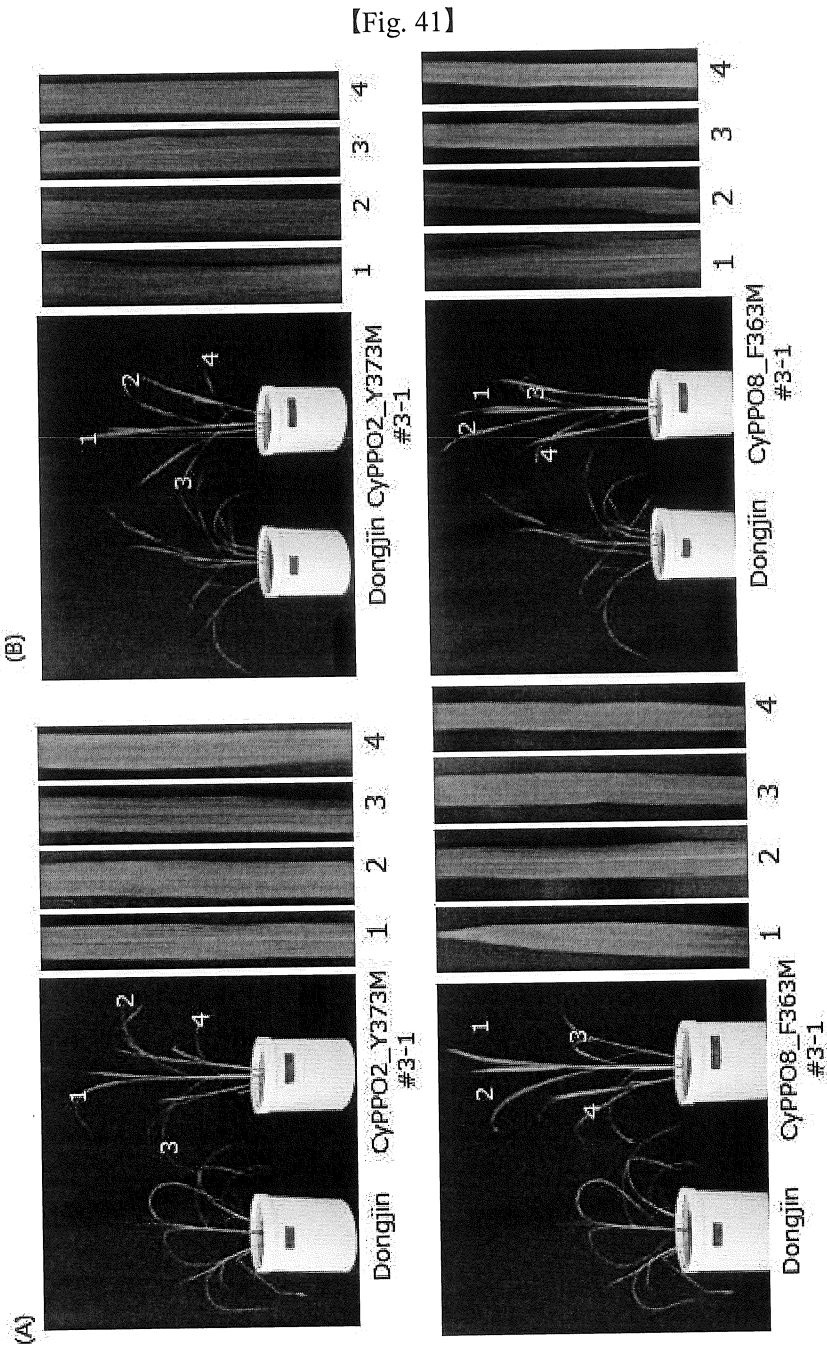


【Fig. 39】

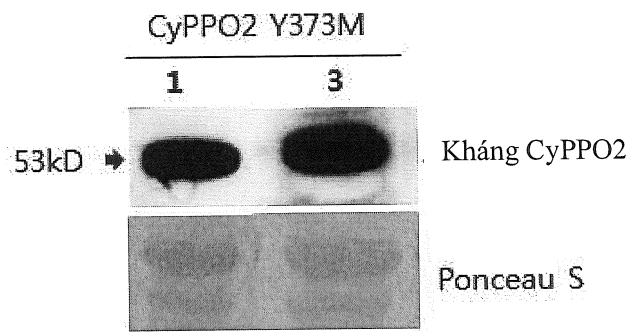


【Fig. 40】

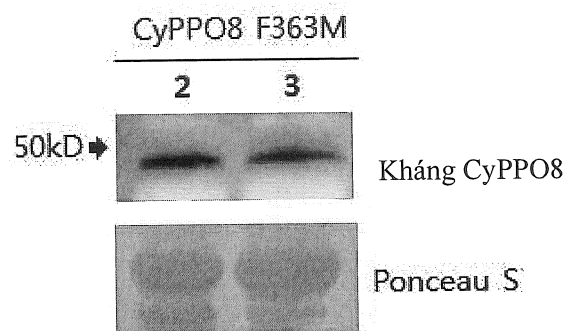




【Fig. 42】



【Fig. 43】

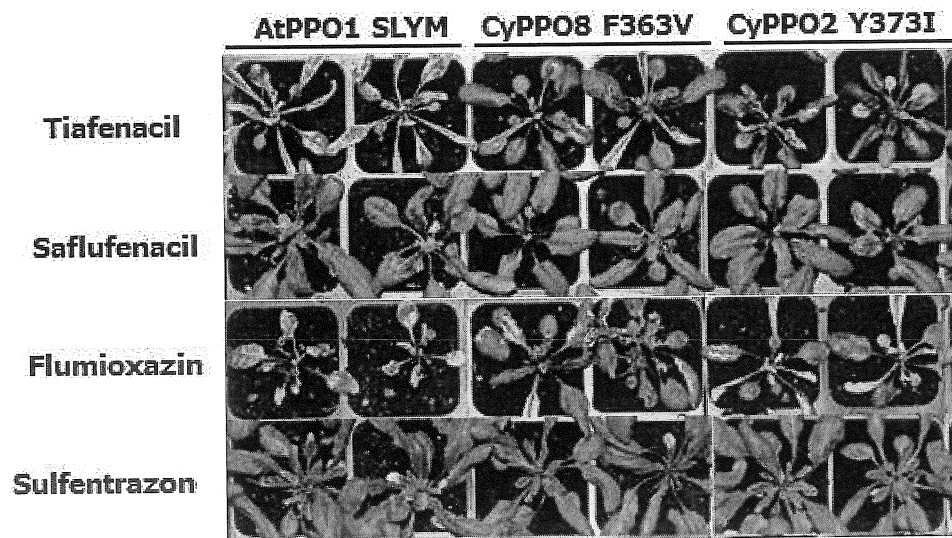


【Fig. 44】

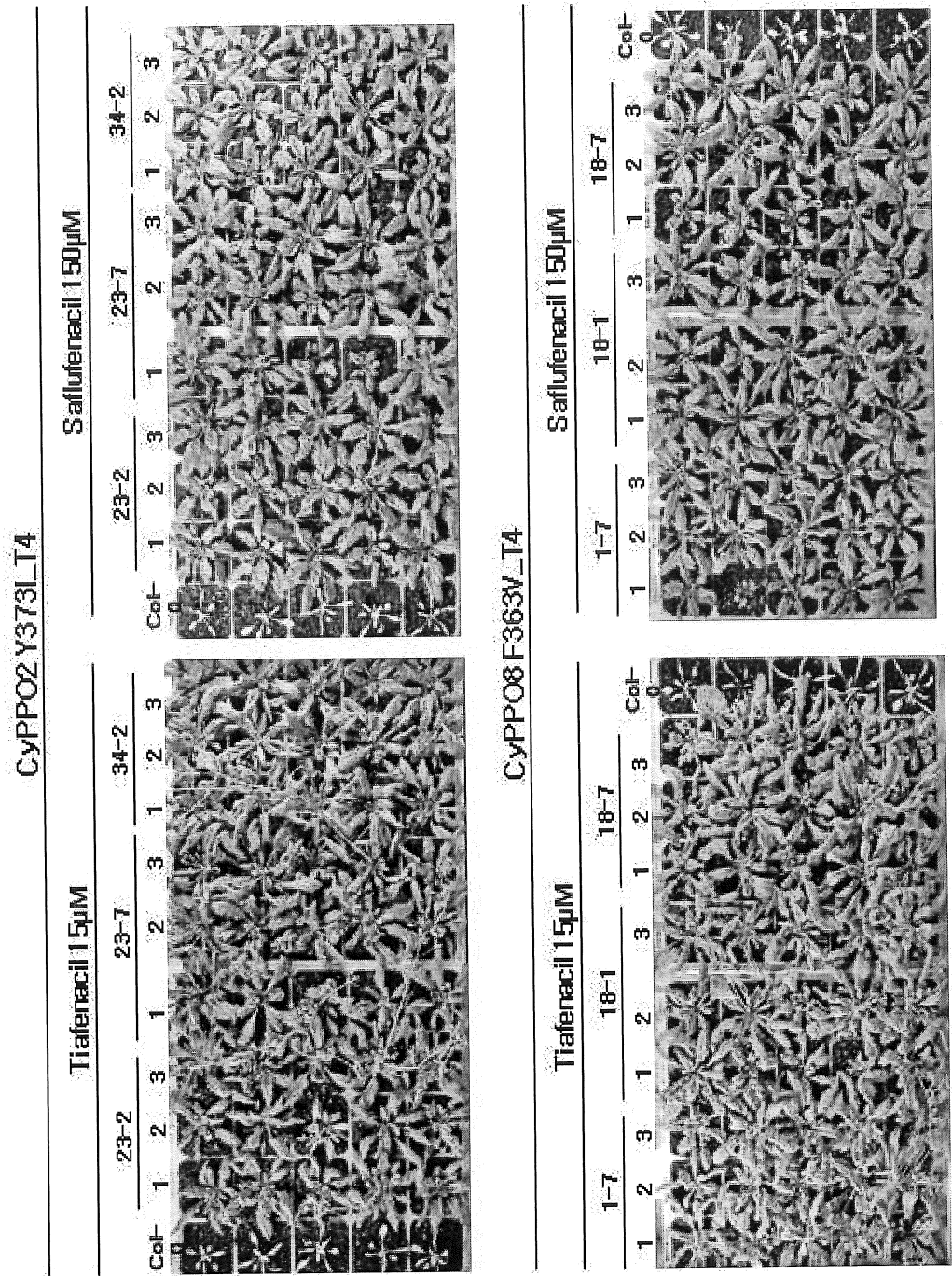
CyPPO8 F363M
Kiểu đại #3 #6



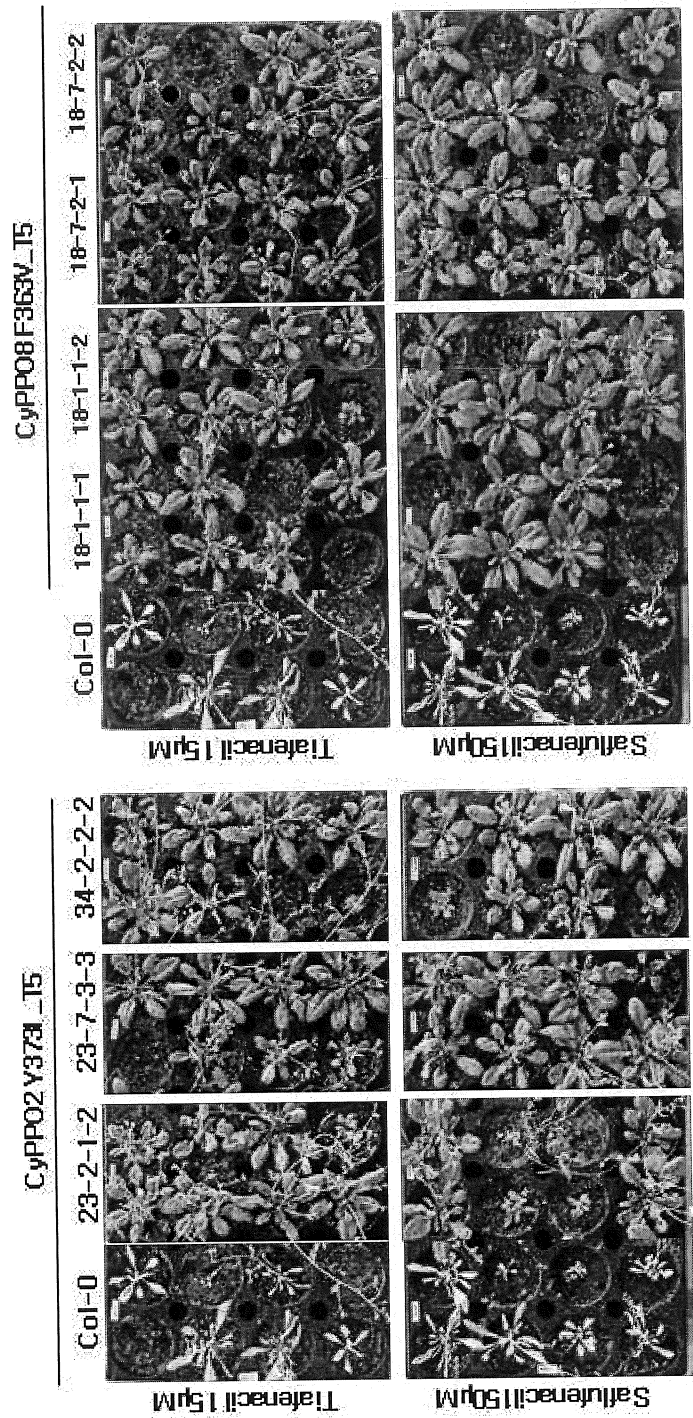
【Fig. 45】



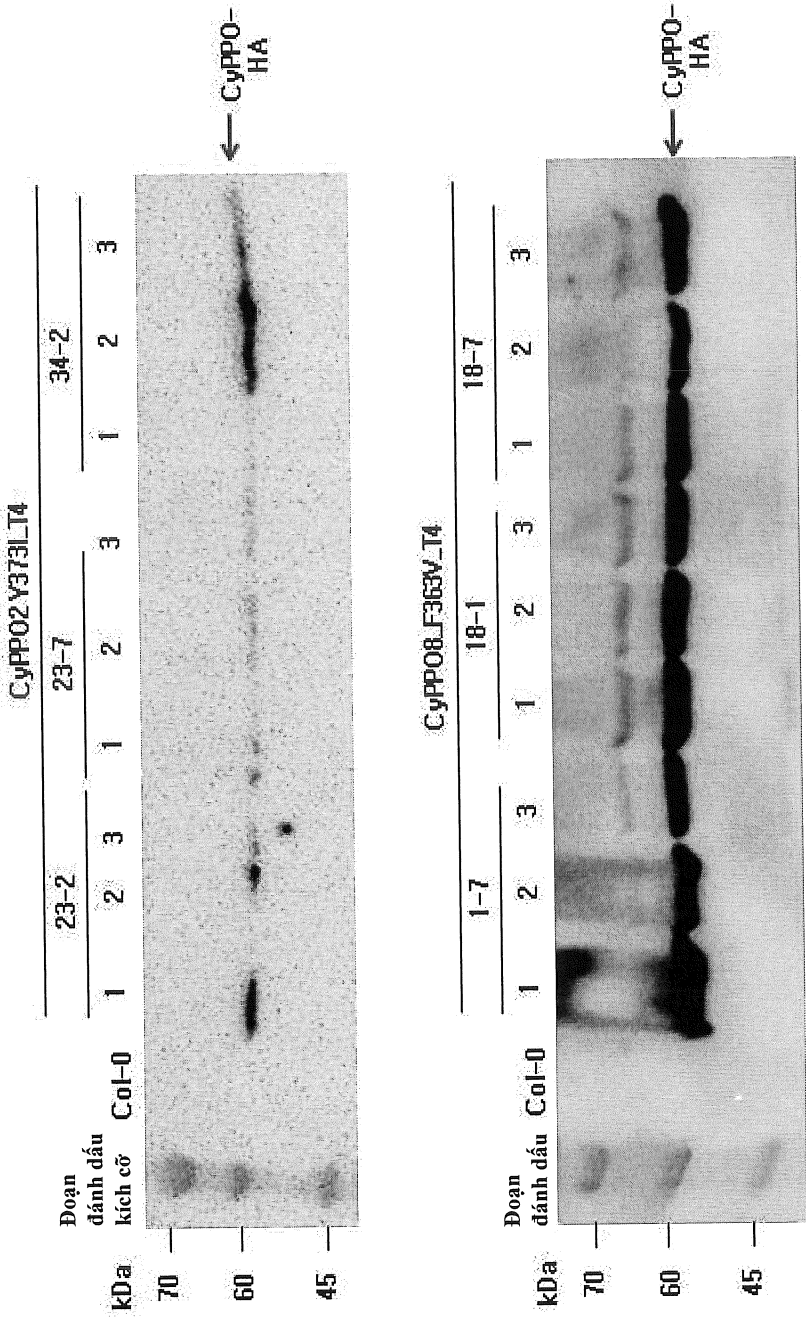
【Fig. 46】



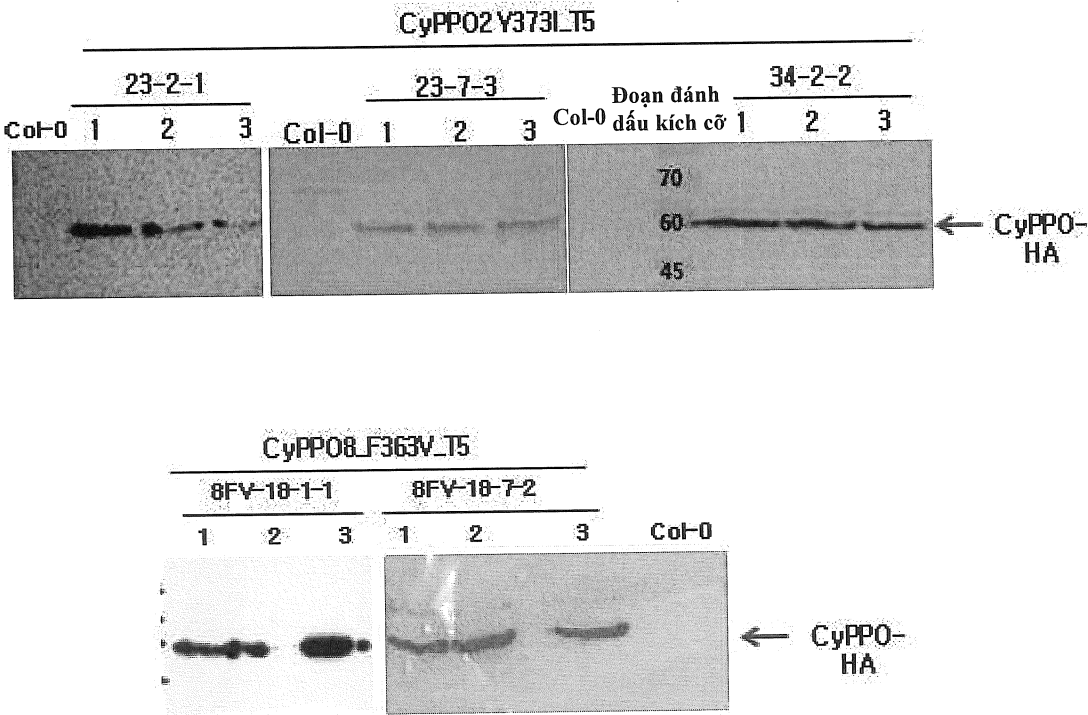
【Fig. 47】



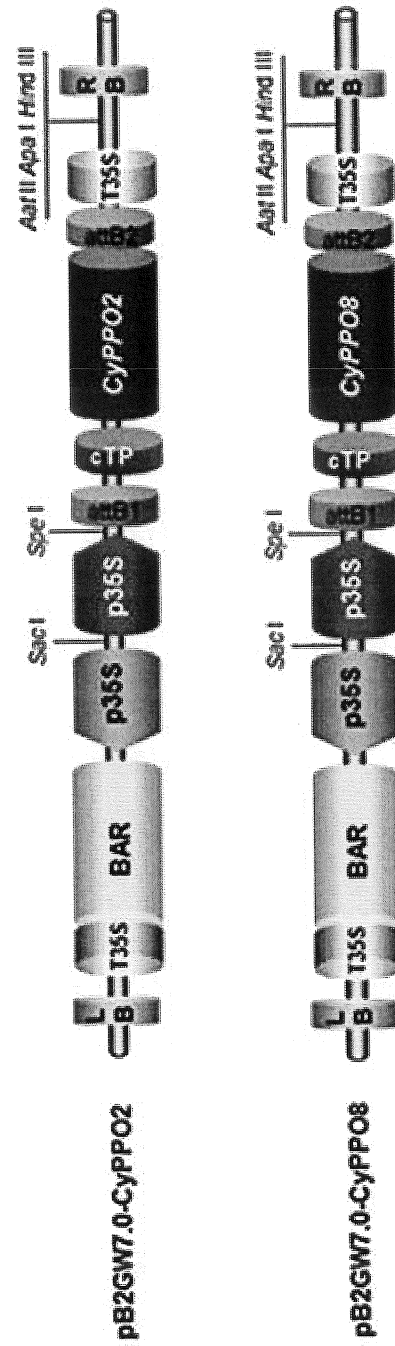
【Fig. 48】



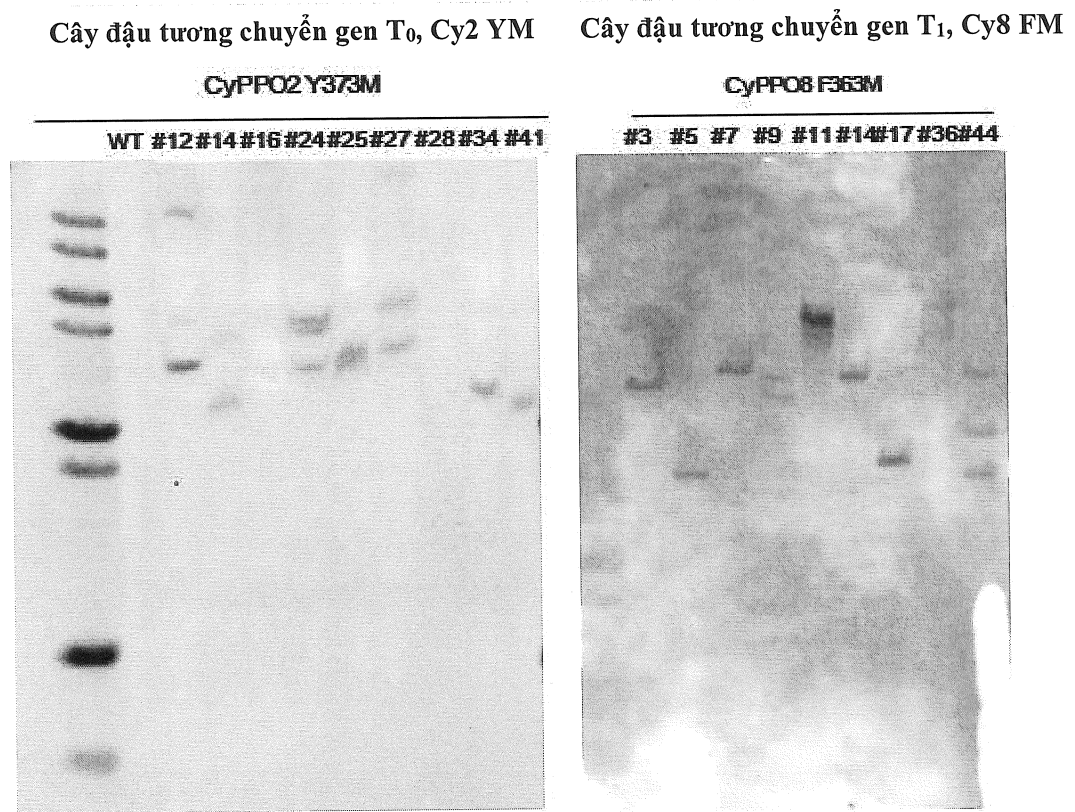
【Fig. 49】



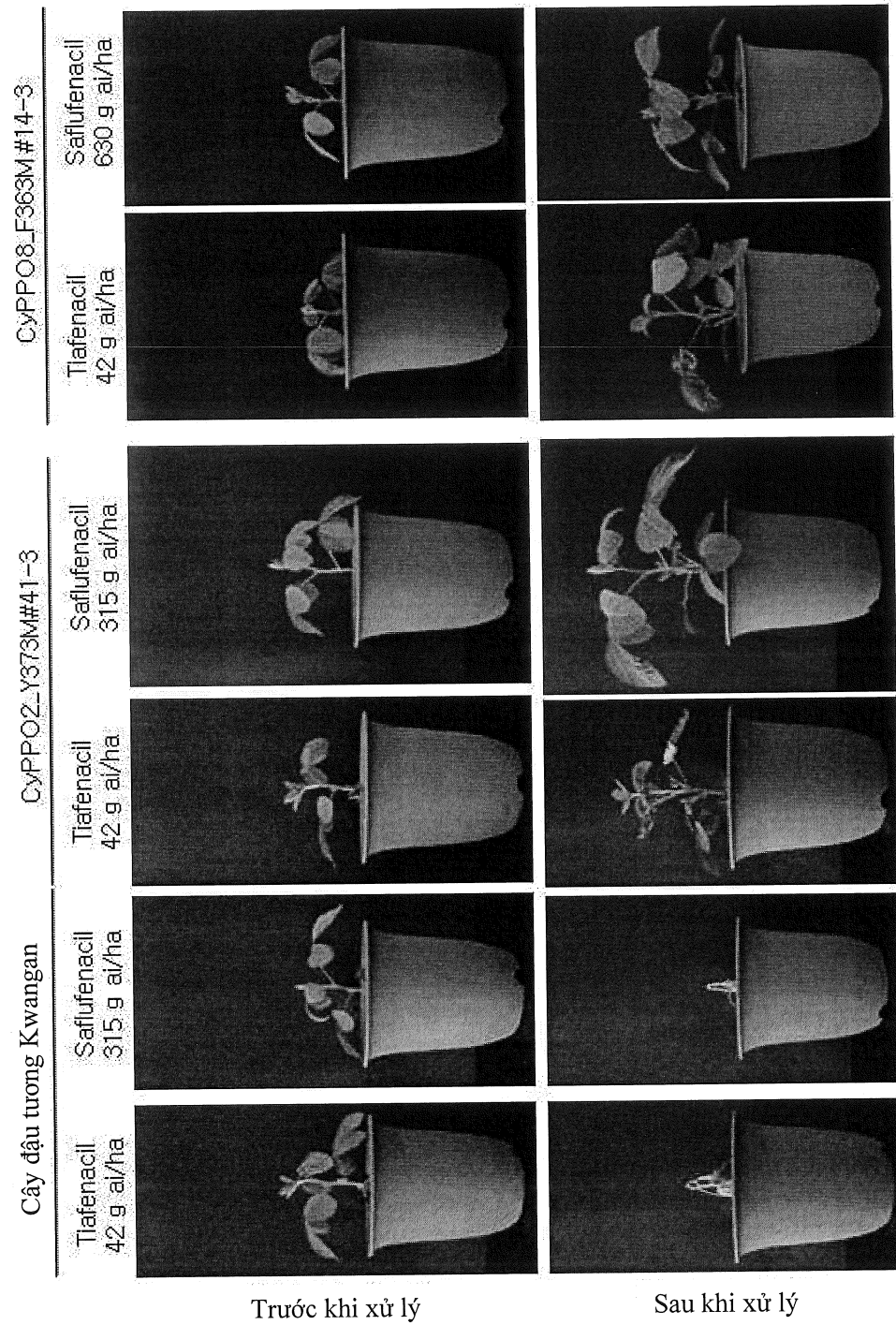
【Fig. 50】



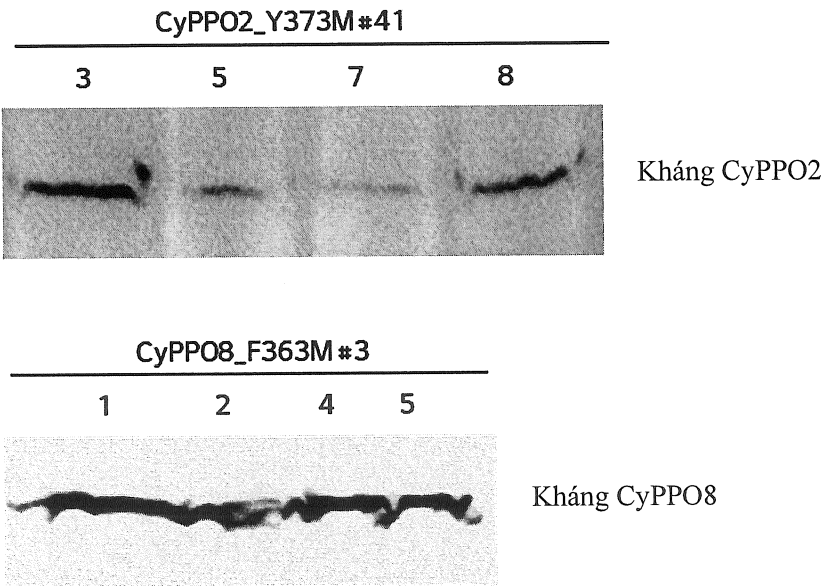
【Fig. 51】



【Fig. 52】



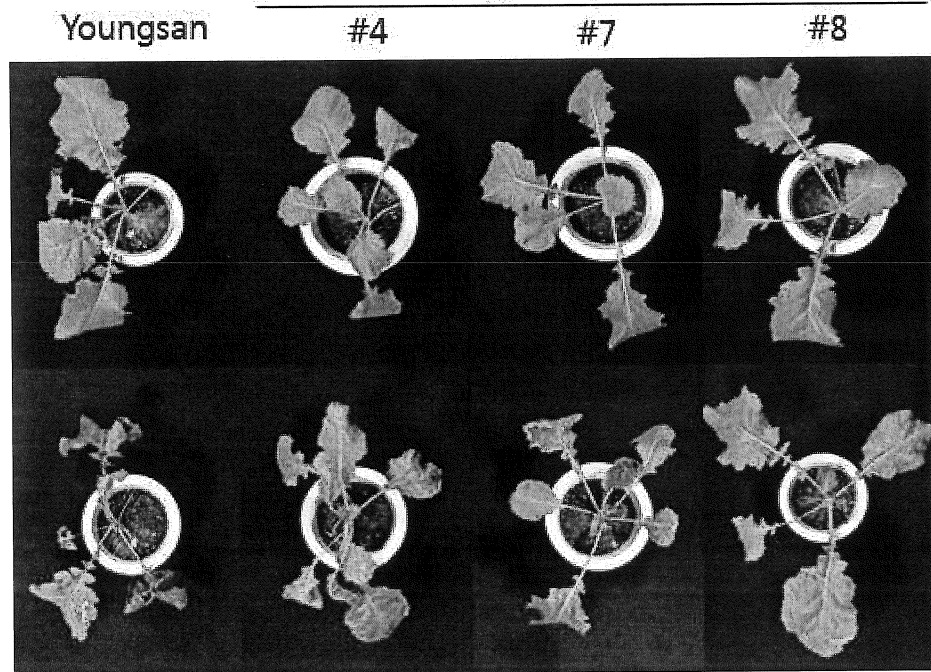
【Fig. 53】



【Fig. 54】

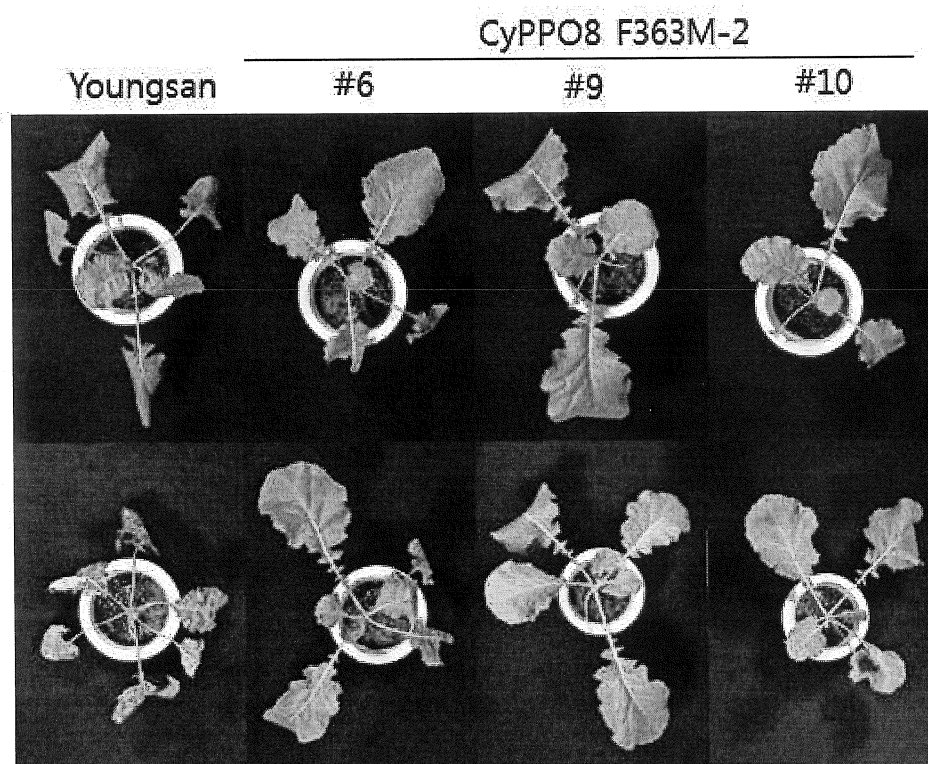
trước khi xử lý 10 μ M Tiafenacil

CyPPO8 F363M-2

7 ngày sau khi xử lý 10 μ M Tiafenacil

【Fig. 55】

trước khi xử lý 10 μ M Saflufenacil



7 ngày sau khi xử lý 10 μ M Saflufenacil

【Fig. 56】

