



(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)



1-0039010

(51)⁷ C12N 15/32

(13) B

(21) 1-2016-02043

(22) 13/11/2014

(86) PCT/CN2014/091023 13/11/2014

(87) WO/2015/070781 21/05/2015

(30) 201310573804.6 15/11/2013 CN

(45) 26/02/2024 431

(43) 26/09/2016 342A

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

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

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

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

(72) Aihong ZHANG (CN); Xiaoming BAO (CN); Haili LIU (CN); Yanxin PEI (CN); Yunzhu ZHANG (CN).

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

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

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát *Prodenia litura*, trong đó *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry1F mà tồn tại trong cây chuyển gen tạo ra protein Cry1F.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại, cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura* ở cây trồng bằng cách biểu hiện protein Cry 1F ở cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

Phương pháp kiểm soát nông nghiệp là sự quản lý và phối hợp toàn diện nhiều yếu tố của toàn bộ hệ sinh thái đất canh tác để điều chỉnh và kiểm soát cây trồng, côn trùng và các yếu tố môi trường để tạo ra một môi trường sinh thái đất canh tác mà có lợi cho sự phát triển cây trồng nhưng không có lợi cho sự xuất hiện của *Prodenia litura*. Ví dụ, nhổ cỏ dại, quay vòng đất và phơi nắng sau khi thu hoạch hoặc tưới tiêu có thể tiêu diệt hoặc hủy hoại các vị trí phát triển nhộng của *Prodenia litura* nhờ vậy làm giảm các nguồn côn trùng; hoặc ví dụ, khối trứng và ấu

trùng mới nở tạo cụm được loại bỏ bằng cách này trong quá trình kiểm soát để làm giảm nguồn côn trùng gây hại. Vì phương pháp kiểm soát nông nghiệp chủ yếu sử dụng các biện pháp ngăn ngừa, nên việc áp dụng phương pháp này bị hạn chế và không được sử dụng làm biện pháp khẩn cấp. Trong trường hợp bùng phát *Prodenia litura*, thì phương pháp này không có tác dụng.

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

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

Để giải quyết được mặt hạn chế của phương pháp kiểm soát nông nghiệp, phương pháp kiểm soát hóa học và phương pháp kiểm soát vật lý khi sử dụng trong thực tế, khi nghiên cứu các nhà khoa học đã phát hiện ra rằng nếu các gen trừ sâu mã hóa các protein trừ sâu được biến nạp vào cây trồng, thì có thể tạo ra một vài

cây chuyển gen trừ sâu có khả năng kiểm soát côn trùng gây hại ở cây trồng. Protein trừ sâu Cry 1F là một trong số nhiều protein trừ sâu. Protein này là một protein tinh thể hình thành quanh một bào tử không hòa tan được tạo ra bởi *Bacillus thuringiensis*.

Protein Cry 1F được tiêu hóa ở ruột giữa bởi côn trùng. Tiền độc tố của protein gây độc được hòa tan trong môi trường kiềm của ruột giữa của côn trùng. Đầu N và đầu C của protein được phân giải bởi proteaza kiềm và tiền độc tố được biến đổi thành các đoạn có hoạt tính. Các đoạn có hoạt tính được gắn kết với các thụ thể ở bề mặt trên của màng biểu mô của ruột giữa côn trùng và được gắn vào màng ruột, dẫn đến các tổn thương lỗ ở màng tế bào, phá hủy sự thay đổi áp suất thẩm thấu và sự cân bằng độ pH giữa bên trong và bên ngoài màng tế bào, gây rối loạn quá trình tiêu hóa của côn trùng và cuối cùng gây chết côn trùng.

Đã được chứng minh rằng cây trồng được cải biến di truyền bởi Cry 1F có thể chống lại sự lan tràn của *Agrotis ypsilon* Rottemberg và các loài côn trùng khác thuộc bộ cánh vảy. Cho đến nay chưa có một báo cáo nào về việc kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng bằng cách tạo ra cây chuyển gen biểu hiện protein Cry 1F.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại, cụ thể là đề xuất phương pháp kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng bằng cách đầu tiên tạo ra cây chuyển gen biểu hiện protein Cry 1F, mà khắc phục được các nhược điểm về mặt kỹ thuật của phương pháp kiểm soát nông nghiệp, phương pháp kiểm soát hóa học, phương pháp kiểm soát vật lý và phương pháp kiểm soát khác một cách hiệu quả trong giải pháp đã biết.

Theo khía cạnh thứ nhất sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*, trong đó côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1F.

Theo một vài phương án, protein Cry 1F là protein Cry 1Fa.

Theo các phương án khác, protein Cry 1Fa tồn tại trong tế bào cây trồng tạo ra protein Cry 1Fa, và côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1Fa nhờ ăn tế bào cây trồng.

Theo các phương án khác, protein Cry 1Fa tồn tại trong cây chuyển gen tạo ra protein Cry 1Fa, côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1Fa nhờ ăn các mô cây chuyển gen, và sau khi tiếp xúc, sự phát triển của côn trùng gây hại *Prodenia litura* bị ức chế và/hoặc côn trùng gây hại *Prodenia litura* chết, nhờ đó kiểm soát được sự gây hại của côn trùng *Prodenia litura* với cây trồng.

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

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

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

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

Trước bước tiếp xúc là bước trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Cry 1Fa.

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

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

tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*, 4) trình tự nucleotit khác với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 do thoái hóa codon và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*.

Theo một vài phương án, cây trồng cũng chứa ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác so với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa.

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

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.

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

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

Theo khía cạnh thứ hai sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein Cry 1F để kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*.

Theo một vài phương án, protein Cry 1F là protein Cry 1Fa.

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

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa bao gồm: 1) trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4, 2) trình tự nucleotit có ít nhất là 75% tính tương đồng với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*, ví dụ, ít nhất là 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% hoặc cao hơn, 3) trình tự nucleotit lai với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 trong các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*, 4) trình tự nucleotit khác với SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 do thoái biến codon và mã hóa trình tự axit amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*.

Theo một vài phương án, protein Cry 1F kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* bằng phương pháp sau: cho protein Cry 1F biểu hiện trong tế bào cây trồng và cho côn trùng gây hại *Acronycta rumicis* ăn tế bào cây trồng này, nhờ đó tiếp xúc với protein Cry 1F.

Theo một vài phương án, protein Cry 1F kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* bằng phương pháp sau: cho protein Cry 1F biểu hiện trong cây chuyển gen và cho côn trùng gây hại *Prodenia litura* ăn các mô của cây chuyển gen, nhờ đó tiếp xúc với protein Cry 1F.

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

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

Sự kiểm soát của protein Cry 1F đối với côn trùng gây hại *Prodenia litura* không thay đổi theo sự thay đổi vị trí trồng và/hoặc thời điểm trồng.

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

Theo một vài phương án, cây trồng cũng chứa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa.

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

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.

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

Theo một vài phương án, trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế các gen

quan trọng ở sâu bọ và côn trùng gây hại đích.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*. Phương pháp này bao gồm đưa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1F vào trong tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen, tốt hơn là, đưa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1F vào bộ gen của tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen.

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

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

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

Theo một vài phương án, protein Cry 1F là protein Cry 1Fa.

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

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

amin có hoạt tính trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*.

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

Theo một vài phương án, phương pháp này cũng bao gồm đưa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1F vào tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen, tốt hơn là, đưa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1F vào bộ gen của tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen.

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

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.

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

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

Theo một vài phương án, trình tự nucleotit mã hóa được đưa vào tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc các bộ phận của cây chuyển gen thông qua phương pháp biến nạp qua trung gian *agrobacterium tumefaciens*, bắn phá phát xạ vết, phân hủy trực tiếp ADN trong tế bào trần, xung điện hoặc biến nạp ADN qua trung gian sợi tinh thể silic oxit, tốt hơn là, biến nạp qua trung gian *agrobacterium tumefaciens*.

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

Theo khía cạnh thứ năm sáng chế đề cập đến việc sử dụng protein Cry 1F để tạo ra tế bào cây trồng, cây chuyển gen hoặc bộ phận của cây chuyển gen kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*. “Protein Cry 1F”, “kiểm soát/việc kiểm soát côn

trùng gây hại *Prodenia litura*”, “cây trồng”, “tế bào cây trồng”, “cây chuyển gen” và “bộ phận của cây chuyển gen” có liên quan đến khía cạnh này cũng như là nội dung mở rộng của chúng được xác định như các khía cạnh nêu trên.

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

gieo ít nhất một loại hạt mang bộ gen chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Cry 1F;

để hạt phát triển thành cây;

để cây phát triển trong điều kiện mà côn trùng gây hại *Prodenia litura* gây hại nhờ lây nhiễm nhân tạo và/hoặc xuất hiện tự nhiên, và thu hoạch cây có mức độ phá hoại giảm và/hoặc có sản lượng tăng so với cây khác không mang trình tự polynucleotit mã hóa protein Cry 1F.

“Protein Cry 1F” và “cây trồng” có liên quan đến khía cạnh này cũng như là nội dung mở rộng của chúng được xác định như các khía cạnh nêu trên. Nghĩa của thuật ngữ “kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*” là tương tự với nghĩa của thuật ngữ “chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura*”. Các định nghĩa cụ thể được mô tả trên đây.

Theo sáng chế, sự biểu hiện protein Cry 1F trong một cây chuyển gen cũng có thể được kèm theo sự biểu hiện của một hoặc nhiều protein trừ sâu loại Vip và/hoặc loại Cry. Việc đồng biểu hiện nhiều hơn một protein trừ sâu trong cùng một cây chuyển gen này có thể được thực hiện bằng kỹ thuật di truyền, để tạo ra cây trồng chứa và biểu hiện gen cần thiết. Ngoài ra, một cây trồng (cây bố mẹ thứ nhất) có thể biểu hiện protein Cry 1F nhờ kỹ thuật di truyền, và cây trồng thứ hai (cây bố mẹ thứ hai) có thể biểu hiện các protein trừ sâu loại Vip và/hoặc loại Cry nhờ kỹ thuật di truyền. Cây con biểu hiện tất cả các gen của cây bố mẹ thứ nhất và cây bố mẹ thứ hai được đưa vào được tạo ra bằng cách lai cây bố mẹ thứ nhất và cây bố mẹ thứ hai.

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

hiệu ở các côn trùng và sâu bọ đích.

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

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

Điểm 2: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 1, khác biệt ở chỗ protein Cry 1F là protein Cry 1Fa.

Điểm 3: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 2, khác biệt ở chỗ protein Cry 1Fa tồn tại trong tế bào cây trồng tạo ra protein Cry 1Fa và côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1Fa nhờ ăn tế bào cây trồng.

Điểm 4: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 3, khác biệt ở chỗ protein Cry 1Fa tồn tại trong cây chuyển gen tạo ra protein Cry 1Fa, côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1Fa nhờ ăn các mô của cây chuyển gen, sự phát triển của côn trùng gây hại *Prodenia litura* được ức chế sau khi tiếp xúc, mà cuối cùng dẫn đến chết côn trùng, nhờ đó kiểm soát được sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng.

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

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

Điểm 7: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 4, khác biệt ở chỗ việc kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng không thay đổi theo sự thay đổi vị trí trồng.

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

Điểm 9: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 8, khác biệt ở chỗ cây trồng này được chọn từ cây ngô, cây đậu tương, cây bông, cây khoai lang, cây khoai sọ, cây sen, cây điền thanh,

cây thuốc lá, cây củ cải đường, cây cải bắp và cây cà tím.

Điểm 10: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, khác biệt ở chỗ bước trước bước tiếp xúc là trồng cây chứa polynucleotit mã hóa protein Cry 1Fa.

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

Điểm 12: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 11, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit của protein Cry 1Fa có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.

Điểm 13: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 12, khác biệt ở chỗ cây trồng này cũng có thể tạo ra ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với protein Cry 1Fa.

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

Điểm 15: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 14, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit thứ hai có thể mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.

Điểm 16: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 15, khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit thứ hai chứa trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.

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

Điểm 18: sử dụng protein Cry 1F để kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là sơ đồ cấu trúc của vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T chứa trình

tự nucleotit Cry 1Fa-01 theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

FIG.2 là sơ đồ cấu trúc của vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 chứa trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

FIG.3 là sơ đồ cấu trúc của vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100015 chứa trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 theo phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại theo sáng chế;

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

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

Mô tả chi tiết sáng chế

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

1. Các vùng phân bố khác nhau: *Prodenia litura* được phân bố trên toàn thế giới, và xuất hiện ở tất cả các nơi của Trung Quốc, chủ yếu ở tỉnh Giang Tây, Giang Tô, Hồ Nan, Hồ Bắc, Chiết Giang và An Huy của lưu vực sông Dương Tử cũng như là các tỉnh như Hà Nam, Hà Bắc và Sơn Đông của lưu vực sông Hoàng Hà. *Spodoptera frugiperda* chủ yếu phân bố ngoài Trung Quốc, bao gồm Canada, Mexico, Mỹ, Ac-hen-tina, Bolivia, Brazil, Chile, Colombia, Ecuador, Guyan thuộc Pháp, Guyan, Paraguay, Peru, Surinam, Uruguay và Venezuela của lục địa Mỹ cũng như là toàn bộ vùng Trung Mỹ và vùng biển Caribe. Trong khi đó *Agrotis ypsilon* Rottemberg là một loài côn trùng phổ biến trên toàn thế giới và được phân bố ở tất cả các nơi của Trung Quốc, cụ thể là, loài côn trùng này xuất hiện với một lượng lớn ở lưu vực sông Dương Tử và bờ biển đông nam, mà có lượng mưa lớn và khí hậu ẩm. Ở phía đông bắc Trung Quốc, loài côn trùng này chủ yếu xuất hiện ở các vùng đông nam ẩm.

2. Đặc tính gây hại khác nhau: Côn trùng *Prodenia lituras* gây hại với toàn bộ cây ở giai đoạn ấu trùng, sống trên mặt sau của lá thành nhóm và gặm biểu bì dưới và thịt lá, chỉ để lại biểu bì trên ở dạng đốm trong suốt khi chúng ở giai đoạn tuổi sớm. Sau tuổi ba, chúng sẽ phân tán và gây hại với lá và thân non. Sau tuổi tư, chúng trở nên tham ăn và gặm lá, chỉ để lại gân lá chính: ấu trùng trưởng thành có thể ăn vào quả; các thói quen ăn của chúng là ăn tạp và gây hại với tất cả các cơ quan. Các côn trùng này hầu ăn khi chúng ở giai đoạn hóa già, vì thế chúng là loài côn trùng rất nguy hiểm. *Agrotis ypsilon Rottemberg* là loài côn trùng sống trong đất. Ở tuổi một và hai, chúng có thể tạo đám trên lá non ở cành trên của cây giống và ăn lá, vì thế gây hại cho cây trồng; sau tuổi ba, chúng sẽ phát tán. Ấu trùng rất nhanh nhẹn về mặt thể chất, có tập tính ngưng hoạt động, và cực kỳ nhạy cảm với ánh sáng, cuộn thành quả cầu khi hoảng sợ, lăn trốn giữa lớp đất khô và lớp đất ẩm của đất bề mặt vào ban ngày, chui ra khỏi đất vào ban đêm để cắn cây giống và tha vào hang của chúng ở trong đất hoặc gặm hạt trong đất. Sau khi thân cây giống cứng, chúng sẽ chuyển sang ăn lá non, lá và phát triển đốm. Nếu thức ăn không đủ hoặc chúng tìm hang qua đông, chúng có hiện tượng di trú. Ấu trùng nhiều tuổi hơn có tốc độ cắn đứt cây cao hơn và sức ăn lớn hơn.

3. Các đặc điểm hình thái khác nhau

- 1) Hình thái trứng khác nhau: Trứng của *Prodenia litura* có dạng hình bán cầu phẳng. Khi chúng đẻ trứng, trứng có màu trắng hơi vàng sau đó chuyển sang xám sẫm, gắn với nhau thành dạng khối, được phủ lông tơ màu nâu. Trong khi đó, trứng của *Agrotis ypsilon Rottemberg* có dạng hình bánh bao. Khi chúng đẻ, trứng có màu ngà và dần chuyển sang màu vàng. Trước khi nở, đỉnh của mỗi quả trứng có đốm đen.
- 2) Hình thái ấu trùng khác nhau: Ấu trùng của *Prodenia litura* có chiều dài nằm trong khoảng từ 33 đến 50mm. Đầu của ấu trùng có màu nâu đen. Màu của ngực hay thay đổi, từ màu vàng như đất đến màu xanh lá cây hơi đen. Toàn bộ bề mặt thân rải rác các đốm trắng nhỏ. Có một cặp chấm đen hình bán nguyệt tương tự với hình tam giác vào ngày đông chí. Ấu trùng thường có sáu tuổi. Trong khi đó, ấu trùng của *Agrotis ypsilon Rottemberg* có hình trụ. Ấu trùng trưởng thành có chiều dài nằm trong khoảng từ 37 đến 50mm. Đầu của chúng

có màu nâu và có các đường lưới không đều màu nâu hơi đen. Thân của chúng có màu từ nâu hơi xám đến nâu sẫm. Bề mặt thân không mịn và có các hạt riêng biệt với kích cỡ khác nhau được phân bố. Đường lưng, dưới đường lưng và đường lỗ thở đều có màu nâu đen, tấm lưng ngực trước có màu nâu sẫm, mặt cánh giữa các chân sau màu nâu hơi vàng có hai vạch dọc màu nâu đen rõ rệt, và các chân ở ngực và các chân ở bụng có màu nâu hơi vàng.

- 3) Hình thái nhộng khác nhau: Ấu trùng của *Prodenia litura* có chiều dài nằm trong khoảng từ 15 đến 20mm. Chúng có hình trụ và màu nâu đỏ. Đuôi của chúng có một cặp gai ngắn. Trong khi đó, nhộng của *Agrotis ypsilon* *Rottemberg* có chiều dài nằm trong khoảng từ 18 đến 24mm. Chúng có màu nâu đỏ nhạt và bóng. Miệng của chúng ngang bằng với cuối cánh lót và đều mở rộng đến mép sau của đốt bụng thứ tư. Ở các đốt bụng thứ 4-thứ 7, giữa mép trước của lưng có màu nâu đen và có các lỗ dày. Các lỗ nhỏ ở hai phía mở rộng đến lỗ thở gần. Các mép trước của các đốt thứ 5-thứ 7 của bụng cũng có các lỗ nhỏ. Phần cuối bụng có một cặp gai bụng ngắn.
- 4) Hình thái khác của con trưởng thành: Các con trưởng thành của *Prodenia litura* có chiều dài nằm trong khoảng từ 14 đến 20mm, sải cánh có chiều dài nằm trong khoảng từ 35 đến 46mm, thân của chúng có màu nâu đen, mặt sau của ngực có cụm lông màu trắng, cánh trước có màu nâu hơi xám và có nhiều kiểu, đường ngang bên trong và bên ngoài có màu trắng và có hình lượn sóng, và ở giữa, có các vạch rộng và chéo màu trắng rõ. Vì lý do này, nó được gọi là *Prodenia litura*. Trong khi đó, các con trưởng thành của *Agrotis ypsilon* *Rottemberg* có chiều dài nằm trong khoảng từ 17 đến 23mm, sải cánh có chiều dài nằm trong khoảng từ 40 đến 54mm, mặt sau của đầu và ngực có màu nâu sẫm, chân có màu nâu, các mép ngoài của cẳng chân trước và ngón chân có màu nâu xám, toàn bộ đốt cuối của phần chân giữa và chân bơi có các hạt hình tròn màu nâu xám, các cánh trước có màu nâu, phần phía trước có màu nâu đen, phần phía trong của mép ngoài chủ yếu có màu nâu đen, đường ranh giới có màu nâu nhạt, có hai đường nằm ngang bên trong lượn sóng màu đen, có một chấm màu xám bên trong hạt hình tròn màu đen, hạt dạng thận có màu đen và có mép màu đen, có một hạt màu đen hình chữ V ở giữa phần bên

ngoài, mà mở rộng đến đường nằm ngang bên ngoài, đường nằm ngang ở giữa có màu nâu sẫm và lượn sóng, các đường nằm ngang bên ngoài lượn sóng kép có màu nâu, đường cận mép ngoài hình chữ chi không đều có màu xám, mép trong có ba khía ở giữa các gân cánh giữa, có các chấm đen nhỏ trên mỗi gân cánh giữa đường cận mép ngoài và đường ngang bên ngoài, đường mép ngoài có màu đen, phần giữa đường ngang và đường cận mép ngoài có màu nâu nhạt, phần ngoài đường cận mép ngoài có màu nâu đen, các cánh sau có màu trắng ngà, các gân cánh dọc và các đường mép có màu nâu, mặt sau của bụng có màu xám.

4. Các tập tính tăng trưởng và quy luật xuất hiện khác nhau: *Prodenia litura* có bốn thế hệ (phía Bắc Trung Quốc)-chín thế hệ (tỉnh Quảng Đông). Nói chung, ấu trùng trưởng thành hoặc nhộng qua đông trong cỏ dại trên các dây cánh đồng. Ở tỉnh Quảng Châu, trong thực tế côn trùng không có hiện tượng qua đông. Ở vùng phía bắc của hạ lưu sông Dương Tử, côn trùng gây hại có thể được đóng băng như chết vào mùa đông, vì thế qua đông không phải là giai đoạn cuối. Đã được nghiên cứu rằng các côn trùng gây hại địa phương có thể được di trú từ phương Nam của Trung Quốc; loài côn trùng này bùng phát chủ yếu vào tháng bảy-tháng tám ở lưu vực sông Dương Tử, và chủ yếu vào tháng tám-tháng chín ở lưu vực sông Hoàng Hà. Các con trưởng thành có tập tính ăn đêm, có khả năng bay khỏe, có tính hướng sáng và có tính hướng hóa chất và đặc biệt nhạy cảm với đường, dấm, rượu và các sản phẩm lên men khác. Mọi bướm đêm cái có thể đẻ từ 3 đến 5 khối trứng. Mỗi khối trứng có từ 100 đến 200 trứng. Trứng chủ yếu được đẻ ở các ngã ba của gân lá ở mặt sau của lá. Trứng được đẻ nhiều ở các cây trồng xanh và sum xuê. Trứng được đẻ thành khối. Các khối trứng thường được phủ lông có vảy, vì thế có thể dễ dàng tìm thấy chúng. Nhiệt độ thích hợp để cho trứng nở là 24°C. Giai đoạn ấu trùng kéo dài từ 14 đến 20 ngày ở nhiệt độ môi trường bằng 25°C. Ấu trùng mới nở có tập tính sinh sống và gây hại theo nhóm. Sau tuổi ba, chúng bắt đầu phát tán. Ấu trùng trưởng thành có tập tính ăn đêm và đôi khi mất ý thức. Vào ban ngày, chúng chủ yếu trốn trong lớp đất. Khi trời tối, chúng bò ra và tìm kiếm thức ăn. Khi chúng sợ, chúng sẽ cuộn lại và giả vờ chết. Khi thức ăn không đủ hoặc không thích hợp, ấu trùng có thể di trú thành nhóm đến các cánh đồng bên cạnh để gây hại cho

cánh đồng này. Do đó, chúng chúng cũng thường được biết đến là “sâu đo”. Độ ẩm trong đất thích hợp để phát triển thành nhộng là 20% lượng nước trong đất. Giai đoạn nhộng kéo dài từ 11 đến 18 ngày. *Prodenia litura* là loài côn trùng ưa nhiệt và chịu được nhiệt độ cao và gây hại lan tràn theo từng giai đoạn. Nhiệt độ thích hợp để phát triển ở mọi giai đoạn của côn trùng là từ 28 đến 30°C, tuy nhiên côn trùng gây hại cũng có thể sống bình thường trong điều kiện nhiệt độ cao (33-40°C). Chúng có khả năng chịu đựng kém với môi trường lạnh. Về cơ bản chúng không thể sống sót trong một thời gian dài ở nhiệt độ thấp khoảng 0°C vào mùa đông. Nói chung, các năm và mùa nóng là thích hợp cho sự phát triển và sinh sản của chúng. Nhiệt độ thấp có thể khiến cho nhộng chết hàng loạt. Côn trùng này là côn trùng ăn tạp, nhưng trong các trường hợp thức ăn phong phú, như các vật chủ khác nhau, ngay cả khi cùng một vật chủ ở các giai đoạn phát triển khác nhau hoặc các cơ quan khác nhau, và sự thiếu hụt hoặc đủ thức ăn có ảnh hưởng rõ rệt đến sự phát triển và sự sinh sản của nó. Các cánh đồng có trồng hoa màu xen vào, thì việc trồng gần như thừa hoặc nhiều loại cây trồng sẽ tạo điều kiện cho côn trùng xuất hiện. Các kẻ thù tự nhiên của côn trùng bao gồm ong ký sinh và virus đa diện ký sinh trên ấu trùng. Trong khi đó, *Agrotis ypsilon* Rottemberg có 3-4 thế hệ một năm. Ấu trùng hoặc nhộng trưởng thành qua đông trong đất. Trong 10 ngày đầu của tháng 3 vào đầu mùa xuân, các con trưởng thành bắt đầu xuất hiện. Nói chung, trong 20 ngày cuối của tháng 3 và 20 ngày đầu của tháng 4, có hai giai đoạn cơ bản của sự xuất hiện bướm đêm. Các con trưởng thành không xuất hiện vào ban ngày mà chủ yếu hoạt động khi trời tối đến nửa đầu đêm. Chúng thích ăn các loại sản phẩm lên men chua, ngọt và có mùi rượu và nhiều loại mật hoa và có tính hướng sáng. Ấu trùng có 6 tuổi. Ấu trùng ở tuổi một và tuổi hai trốn trong cỏ dại và trong lá của cây trồng. Chúng ăn vào ban ngày và đêm và sức ăn nhỏ. Sự gây hại của chúng là không đáng kể. Sau tuổi ba, chúng trốn dưới mặt đất vào ban ngày và gây hại cây trồng vào ban đêm. Sức ăn của ấu trùng ở tuổi năm và tuổi sáu tăng lên một cách đáng kể. Mỗi ấu trùng có thể cắn đứt 4-5 cây giống con một đêm, thậm chí là hơn 10 cây giống con. Sau tuổi ba, ấu trùng có khả năng kháng thuốc tốt hơn một cách đáng kể. Giai đoạn từ cuối tháng 3 đến 10 ngày thứ hai của tháng 4 là giai đoạn mà ấu trùng thế hệ thứ nhất gây hại nghiêm trọng. Tất cả các thế hệ xuất hiện và gây hại ở giai đoạn từ

tháng 10 đến tháng 4 năm tiếp theo. Có 2 đến 3 thế hệ ở vùng tây bắc, 2-3 thế hệ ở phía bắc của Vạn Lý Trường Thành, 3 thế hệ từ phía nam của Vạn Lý Trường Thành đến phía bắc của sông Hoàng Hà, 4 thế hệ từ phía nam của sông Hoàng Hà đến bờ của sông Dương Tử, 4-5 thế hệ đến phía nam của sông Dương Tử và 6-7 thế hệ ở vùng nhiệt đới của khu vực Nam Á. Bất kể số thế hệ xuất hiện hàng năm, ấu trùng ở thế hệ thứ nhất gây hại lớn đối với sản xuất: ở phía nam, các con trưởng thành ở thế hệ qua đông xuất hiện vào tháng 2. Giai đoạn xuất hiện chủ yếu là từ 10 ngày cuối của tháng 3 đến 20 ngày đầu của tháng 4 ở hầu hết các vùng của Trung Quốc và 10 ngày cuối của tháng 4 ở Ninh Hạ và Nội Mông. Các con trưởng thành của *Agrotis ypsilon Rottemberg* xuất hiện chủ yếu từ 3:00 chiều ~ 10:00 tối. Chúng trốn trong các lá khô và các khe hở vào ban ngày và bay và tìm kiếm thức ăn sau khi trời tối. 3-4 ngày sau đó, chúng giao phối và đẻ trứng. Trứng được đẻ trong cỏ rậm rạp và thấp và trên các cây giống con theo cách rải rác. Một số lượng nhỏ trứng được đẻ trên lá úa và các lớp đất. Ở các vị trí gần khu đất, có nhiều trứng nhất. Mỗi con cái đẻ 800-1000, thậm chí 2000 trứng. Giai đoạn đẻ trứng là 5 ngày. Ấu trùng có 6 tuổi, 7-8 tuổi ở một vài trường hợp cụ thể. Giai đoạn ấu trùng có sự khác biệt lớn giữa các vùng, nhưng thế hệ thứ nhất là 30-40 ngày; sau khi trưởng thành, ấu trùng được phát triển thành nhộng trong các hang đất có độ sâu 5cm. Giai đoạn ấu trùng là 9 đến 19 ngày; nhiệt độ cao là không thích hợp cho sự phát triển và sinh sản của *Agrotis ypsilon Rottemberg*, vì thế mức xuất hiện của nó là nhỏ vào mùa hè và nhiệt độ sống sót thích hợp nằm trong khoảng từ 15°C đến 25°C; nhiệt độ vào mùa đông là quá thấp, và vì thế tỷ lệ chết của ấu trùng *Agrotis ypsilon Rottemberg* sẽ tăng; mức xuất hiện là lớn ở địa hình thấp và ẩm với trận mưa rào lớn. Vào năm thứ nhất, nếu trận mưa rào vào mùa thu là lớn, độ ẩm trong đất cao và cỏ dại mọc lên như nấm sau mưa, đây là điều kiện thích hợp cho sự đẻ trứng của các con trưởng thành và cung cấp thức ăn cho ấu trùng. Đây là dấu hiệu của sự bùng nổ vào năm thứ hai; tuy nhiên, trận mưa lớn và độ ẩm cao lại không thích hợp cho sự phát triển của ấu trùng. Ấu trùng ở tuổi 1 dễ bị chết sau khi bị ngập lụt. Ở khu vực có lượng nước bằng 15-20% trong đất trong suốt giai đoạn đẻ trứng chủ yếu của các con trưởng thành, sự gây hại là nghiêm trọng. Đất cát dễ thấm nước hơn, thoát nước nhanh và thích hợp cho sự sinh sản của *Agrotis ypsilon Rottemberg*, trong khi đó đất

sét và cát nặng có mức xuất hiện ít hơn.

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

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

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

Thuật ngữ “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” dùng trong sáng chế có nghĩa là côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1F, và sau khi tiếp xúc, sự phát triển của côn trùng gây hại *Prodenia litura* bị ức chế và/hoặc côn trùng gây hại *Prodenia litura* sẽ chết. Ngoài ra, côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1F nhờ ăn các mô cây trồng. Sau khi tiếp xúc, sự phát triển của toàn bộ hoặc một vài côn trùng gây hại *Prodenia litura* bị ức chế và/hoặc toàn bộ hoặc một vài trong số chúng sẽ chết. Ức chế có nghĩa là gần chết, tức là không có nghĩa là chết, nhưng có thể tạo ra các tác dụng nhất định lên các mặt nhất định như sự tăng trưởng và sự phát triển, tập quán, chức năng sinh lý, chức năng sinh hóa và các mô, ví dụ: sự tăng trưởng và phát triển chậm dần và/hoặc ngừng. Trong khi đó, cây trồng vẫn có hình thái bình thường và có thể được trồng bằng các phương pháp thông thường dùng để tiêu thụ và/hoặc tạo ra các sản phẩm. Ngoài ra, so với các cây trồng kiểu đại không chuyển gen, cây trồng và/hoặc hạt cây trồng kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* mà chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Cry 1F có mức phá hoại cây trồng giảm trong điều kiện mà côn trùng gây hại *Prodenia litura* gây hại do lây nhiễm nhân tạo và/hoặc xuất hiện tự nhiên. Biểu hiện cụ thể bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: khả năng chống chịu của thân được cải thiện, và/hoặc sản lượng và/hoặc khối lượng hạt tăng. Chức năng “kiểm soát” và/hoặc

“phòng ngừa” của protein Cry 1F đối với côn trùng gây hại *Prodenia litura* có thể tồn tại một cách độc lập và không giảm bớt và/hoặc biến mất do sự tồn tại của các chất khác mà có thể “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” côn trùng gây hại *Prodenia litura*. Cụ thể là, nếu các mô của cây chuyển gen (chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Cry 1F) đồng thời và/hoặc không đồng thời chứa và/hoặc tạo ra protein Cry 1F và/hoặc chất khác mà có khả năng kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*, thì sự tồn tại của chất khác này sẽ không làm ảnh hưởng đến chức năng “kiểm soát” và/hoặc “phòng ngừa” của protein Cry 1F đối với *Prodenia litura*, cũng như không thể dẫn đến việc chức năng “kiểm soát” và/hoặc “ngăn ngừa” hoàn toàn là do chất khác, mà không có liên quan đến protein Cry 1F. Trong các điều kiện bình thường, trên đất canh tác, quá trình tiêu hóa các mô cây trồng bởi côn trùng gây hại *Prodenia litura* diễn ra nhanh và khó có thể quan sát được bằng mắt thường, do đó, trong điều kiện mà côn trùng *Prodenia litura* gây hại do lây nhiễm nhân tạo và/hoặc xuất hiện tự nhiên, nếu mô bất kỳ của cây chuyển gen (chứa trình tự polynucleotit mã hóa protein Cry 1F) làm chết côn trùng gây hại *Prodenia litura*, và/hoặc côn trùng gây hại *Prodenia litura* mà sự phát triển của nó bị ức chế ở trên chúng, và/hoặc sự phá hoại cây trồng được làm giảm so với cây trồng kiểu đại không chuyển gen, có nghĩa là phương pháp và cách sử dụng theo sáng chế được thực hiện, tức là: phương pháp và/hoặc sử dụng để kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* được thực hiện bằng cách cho côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein Cry 1F.

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

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

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

Phân tử axit nucleic hoặc mạch của nó theo sáng chế được lai với gen Cry 1Fa theo sáng chế trong các điều kiện nghiêm ngặt. Phương pháp thông thường bất kỳ để lai hoặc khuếch đại axit nucleic có thể được sử dụng để xác định sự tồn tại của gen Cry 1Fa theo sáng chế. Trong các điều kiện cụ thể, phân tử axit nucleic hoặc đoạn của nó có thể được lai đặc hiệu với các phân tử axit nucleic khác. Theo sáng chế, nếu hai phân tử axit nucleic có thể tạo thành cấu trúc axit nucleic mạch kép đối song song, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này có thể lai đặc hiệu với nhau. Nếu hai phân tử axit nucleic bổ sung hoàn toàn, thì một phân tử axit nucleic là “mạch bổ sung” của phân tử axit nucleic còn lại. Theo sáng chế, nếu mọi nucleotit của phân tử axit nucleic bổ sung với nucleotit tương ứng của phân tử axit nucleic khác, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này “bổ sung hoàn toàn với nhau”. Nếu hai phân tử axit nucleic có thể được lai với nhau trong điều kiện đủ ổn định, nhờ đó cho phép chúng bắt cặp và liên kết với nhau ít nhất là trong điều kiện “nghiêm ngặt kém” thông thường, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này “bổ sung với nhau ở mức tối thiểu”. Tương tự, nếu hai phân tử axit nucleic có thể lai với nhau trong điều kiện đủ ổn định, nhờ đó cho phép chúng bắt cặp và liên kết với nhau ít nhất là trong điều kiện “rất nghiêm ngặt” thông thường, thì có thể nói rằng hai phân tử axit nucleic này có “khả năng bổ sung”. Có thể chấp nhận không đạt được sự bổ sung hoàn toàn miễn là sự lệch bổ sung không ngăn cản hoàn toàn hai phân tử tạo ra cấu trúc mạch kép. Để cho phép một phân tử axit nucleic có thể được sử dụng làm đoạn mồi hoặc mẫu dò, thì chỉ cần đảm bảo sự bổ sung đủ trên

trình tự để tạo ra cấu trúc mạch kép ổn định trong dung môi cụ thể chấp nhận được và ở nồng độ muối cụ thể.

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

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

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

sinh học chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura* là giống hoặc về cơ bản giống hoạt tính sinh học của protein được bảo hộ.

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

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

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

trong sáng chế. Sau đó từ các vi sinh vật có thể thu được các gen mã hóa các protein này.

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

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

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

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

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

Theo sáng chế, protein Cry 1F bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: protein Cry 1Fa2, Cry 1Fa3, Cry 1Fb3, Cry 1Fb6 hoặc Cry 1Fb7, hoặc các đoạn trừ sâu hoặc các vùng chức năng có ít nhất là 70% tính tương đồng với trình tự axit amin của các protein nêu trên và có hoạt tính trừ sâu chống lại *Prodenia litura*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Protein Cry 1F theo sáng chế là độc với côn trùng gây hại *Prodenia litura*. Bộ gen của cây trồng theo sáng chế, cụ thể là cây đậu tương và cây ngô, chứa ADN ngoại sinh, mà chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1F. Côn trùng gây hại *Prodenia litura* tiếp xúc với protein này nhờ ăn các mô cây trồng. Sau khi tiếp xúc,

sự phát triển của côn trùng gây hại *Prodenia litura* được ức chế và cuối cùng dẫn đến chết. Ức chế được dùng để chỉ khả năng gây chết hoặc khả năng gây gần chết. Trong khi đó, cây trồng vẫn có hình thái bình thường và có thể được trồng bằng các phương pháp thông thường để được dùng để tiêu thụ và/hoặc tạo ra các sản phẩm. Hơn thế nữa, về cơ bản cây trồng có thể không cần sử dụng các thuốc trừ sâu hóa học hoặc sinh học (thuốc trừ sâu hóa học hoặc sinh học là các thuốc trừ sâu chống lại côn trùng gây hại *Prodenia litura* được nhắm tới bởi protein Cry 1F).

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

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

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

Ngoài ra, catxet biểu hiện chứa trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1F theo sáng chế cũng có thể được biểu hiện cùng với ít nhất là một gen mã hóa protein kháng thuốc diệt cỏ. Gen kháng thuốc diệt cỏ bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: gen kháng phosphinothrixin (như: gen bar và gen pat), gen kháng phenmedipham (như: gen pmph), gen kháng glyphosat (như: gen EPSPS), gen kháng bromoxynil, gen kháng sulfonyleure, gen kháng thuốc diệt cỏ dalapon, gen kháng xyanamit hoặc gen kháng chất ức chế glutamin synthetaza (như: PPT), nhờ đó tạo ra cây chuyển gen có cả hoạt tính trừ sâu và khả năng kháng thuốc diệt cỏ cao.

Theo sáng chế, ADN ngoại sinh được đưa vào cây trồng. Ví dụ, gen hoặc catxet biểu hiện hoặc vectơ tái tổ hợp mã hóa protein Cry 1F được đưa vào tế bào cây trồng. Phương pháp biến nạp thông thường bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở: biến nạp qua trung gian *agrobacterium tumefaciens*, phương pháp bắn phá phát

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

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

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

các điều kiện môi trường để kiểm soát côn trùng gây hại và có nhiều nhân tố biến đổi. Sáng chế tạo ra protein Cry 1F được biểu hiện trong cây trồng và nhờ vậy tránh được nhược điểm điều kiện môi trường không ổn định một cách hiệu quả. Hơn thế nữa, tác dụng kiểm soát của cây chuyển gen (Protein Cry 1F) được đề xuất bởi sáng chế là ổn định và phù hợp với nhiều nơi khác nhau, thời điểm khác nhau, và tình trạng di truyền khác nhau.

6. Tính đơn giản, thuận tiện và kinh tế: Phương pháp kiểm soát vật lý trong giải pháp đã biết gặp phải các khó khăn nhất định đối với hoạt động sản xuất nông nghiệp, trong khi đó sáng chế chỉ cần trồng cây chuyển gen biểu hiện protein Cry 1F và không cần tiến hành thêm các biện pháp nào khác, nhờ vậy tiết kiệm được một lượng lớn nhân công, nguyên liệu và chi phí.
7. Tác dụng triệt để: Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* được sử dụng trong giải pháp đã biết không có tác dụng triệt để và chỉ đóng vai trò làm giảm bớt mức độ gây hại, trong khi đó cây chuyển gen (protein Cry 1F) được đề xuất bởi sáng chế có thể gây chết hàng loạt ấu trùng mới nở của *Prodenia litura* và ức chế đáng kể sự phát triển của một tỷ lệ nhỏ ấu trùng còn sống. 3 ngày sau đó, ấu trùng về cơ bản ở giai đoạn mới nở hoặc giai đoạn nằm giữa giai đoạn mới nở và kiểm soát bị động, tất cả đều bị phát triển dị dạng và đã ngừng phát triển. Cây chuyển gen phần lớn chỉ bị thiệt hại nhẹ.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thu nhận và tổng hợp gen Cry 1Fa

1. Thu nhận trình tự nucleotit Cry 1Fa

Trình tự axit amin của protein trừ sâu Cry 1Fa-01 (605 axit amin), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 mã hóa trình tự axit amin tương ứng (605 axit amin) của protein trừ sâu Cry 1Fa-01 (1818 nucleotit), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự; trình tự axit amin của protein trừ sâu Cry 1Fa-02 (1148 axit amin), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 2 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 mã hóa trình tự axit amin tương ứng (1148 axit amin) của protein trừ sâu Cry 1Fa-02 (3447 nucleotit),

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

2. Thu nhận các trình tự nucleotit Cry 1Ab và Vip3A

Trình tự nucleotit Cry 1Ab mã hóa trình tự axit amin (818 axit amin) của protein trừ sâu Cry 1Ab (2457 nucleotit), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự; trình tự nucleotit Vip3A mã hóa trình tự axit amin (789 axit amin) của protein trừ sâu Vip3A (2370 nucleotit), được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự.

3. Tổng hợp các trình tự nucleotit nêu trên

Trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự), trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự), trình tự nucleotit Cry 1Ab (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự) và trình tự nucleotit Vip3A (như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự) được tổng hợp bởi GenScript (Nanjing) Co., Ltd.; đầu 5' của trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 tổng hợp (SEQ ID NO: 3) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *AscI*, và đầu 3' của trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 (SEQ ID NO: 3) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *BamHI*; đầu 5' của trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 tổng hợp (SEQ ID NO: 4) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *AscI*, và đầu 3' của trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 (SEQ ID NO: 4) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *BamHI*; đầu 5' của trình tự nucleotit Cry 1Ab tổng hợp (SEQ ID NO: 5) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *NcoI*, và đầu 3' của trình tự nucleotit Cry 1Ab (SEQ ID NO: 5) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *SpeI*; đầu 5' của trình tự nucleotit Vip3A tổng hợp (SEQ ID NO: 6) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *ScaI*, và đầu 3' của trình tự nucleotit Vip3A (SEQ ID NO: 6) cũng được liên kết với vị trí giới hạn *SpeI*.

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

1. Tạo vector tách dòng tái tổ hợp chứa gen Cry 1F

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

(trong đó, Amp viết tắt cho gen kháng ampicilin; f1 viết tắt cho điểm khởi đầu tái bản của thể thực khuẩn f1; LacZ viết tắt cho codon khởi đầu của LacZ; SP6 viết tắt cho trình tự khởi đầu ARN polymeraza SP6; T7 viết tắt cho trình tự khởi đầu ARN polymeraza T7; Cry 1Fa-01 viết tắt cho trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 (SEQ ID NO: 3); MCS viết tắt cho nhiều vị trí tách dòng).

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

20°C để sử dụng sau.

Sau đó plasmit đã chiết được phân cắt và được xác định bằng AscI và BamHI, dòng dương tính được đánh giá bằng cách giải trình tự. Kết quả giải trình tự chỉ ra rằng trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 được cài trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T là trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 được cài chính xác.

Theo phương pháp tạo vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 tổng hợp được gắn vào vector tách dòng pGEM-T để thu được vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T, trong đó Cry 1Fa-02 là trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 (SEQ ID NO: 4). Phân cắt bằng enzym và giải trình tự chỉ ra rằng trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 trong vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T được cài chính xác.

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

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

2. Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp chứa gen Cry 1F

Enzym giới hạn endonucleaza AscI và BamHI được sử dụng để phân cắt vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-01 (khung vector: pCAMBIA2301 (có thể được cung cấp bởi tổ chức CAMBIA)) tương ứng. Các đoạn cắt của trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 được cài vào các vị trí giữa AscI và BamHI của vector biểu hiện DBNBC-01. Việc áp dụng phương pháp phân cắt thông thường để tạo ra vector là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014. Cấu trúc của vector này được thể hiện trên FIG.2 (Kan: gen kanamycin; RB: biên phải; Ubi: trình tự khởi đầu của gen ubiquitin ở cây ngô (SEQ ID NO: 7); Cry 1Fa-01; trình tự

nucleotit Cry 1Fa-01 (SEQ ID NO: 3); Nos: trình tự kết thúc của gen nopalinsynthaza (SEQ ID NO: 8); PMI: gen phosphomanoza isomeraza (SEQ ID NO: 9); LB: biên trái).

Vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 được sử dụng để biến nạp vào tế bào khả biến *Escherichia coli* T1 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các điều kiện sốc nhiệt là: giữ 50µl tế bào khả biến *Escherichia coli* T1 và 10µl ADN plasmit (vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100014) trong bể nước 42°C trong 30 giây; lắc và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ (lắc trên bàn lắc ở tốc độ 100 vòng/phút); sau đó nuôi cấy trên đĩa LB rắn (trypton 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L, NaCl 10g/L, thạch 15g/L; điều chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH) chứa 50mg/L kanamycin ở nhiệt độ 37°C trong 12 giờ, lấy các khuẩn lạc màu trắng, và nuôi cấy chúng qua đêm trong môi trường lỏng LB (trypton 10g/L, dịch chiết nấm men 5g/L, NaCl 10g/L và kanamycin 50mg/L; điều chỉnh pH đến 7,5 bằng NaOH) ở nhiệt độ 37°C; chiết plasmit của nó bằng phương pháp kiềm. Phân cắt plasmit đã chiết bằng enzym giới hạn endonucleaza *AscI* và *BamHI* và sau đó xác định, giải trình tự và nhận dạng các dòng dương. Kết quả cho thấy rằng trình tự nucleotit của vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 giữa các vị trí *AscI* và *BamHI* là trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01.

Theo phương pháp tạo vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 cắt ra từ vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN02-T được phân cắt bởi *AscI* và *BamHI* được cài vào vectơ biểu hiện DBNBC-01 để thu được vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100013. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng trình tự nucleotit trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100013 bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, có thể liên kết với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab cắt ra từ các vectơ tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN03-T được phân cắt bởi *AscI* và *BamHI*, *NcoI* và *SpeI* tương ứng được cài vào vectơ biểu hiện DBNBC-01 để thu được vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100075. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100075 bao gồm các trình tự nucleotit được

thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab, có thể liên kết với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Vip3A cắt ra từ các vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN04-T được phân cắt bởi AscI và BamHI, ScaI và SpeI tương ứng được cài vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100276 bao gồm các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Vip3A, có thể liên kết với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100014 nêu trên, enzym giới hạn endonucleaza AscI và BamHI được sử dụng để phân cắt vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và vector biểu hiện DBNBC-02 (khung vector: pCAMBIA2301 (có thể được cung cấp bởi tổ chức CAMBIA)) tương ứng. Các đoạn cắt của trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 được cài vào các vị trí giữa AscI và BamHI của vector biểu hiện DBNBC-02. Sử dụng phương pháp phân cắt thông thường để tạo ra vector là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100015. Cấu trúc của vector này được thể hiện trên FIG.3 (Kan: gen kanamycin; RB: biên phải; Ubi: trình tự khởi đầu của gen Ubiquitin ở cây ngô (SEQ ID NO: 7); Cry 1Fa-01: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 (SEQ ID NO: 3); Nos: trình tự kết thúc của gen nopal synthase (SEQ ID NO: 8); PAT: gen glufosinat acetyltransferase (SEQ ID NO: 22); LB: biên trái).

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100015 nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 cắt ra từ vector tách dòng tái tổ hợp DBN02-T được phân cắt bởi AscI và BamHI được cài vào vector biểu hiện DBNBC-02 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100030. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100030 bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 4 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, có thể liên kết với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100015 nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab cắt ra từ vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN03-T được phân cắt bởi AscI và BamHI, NcoI và SpeI tương ứng được cài vào vector biểu hiện DBNBC-02 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100012. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100012 bao gồm các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Cry 1Ab, có thể liên kết với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

Theo phương pháp tạo vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100015 nêu trên, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Vip3A cắt ra từ vector tách dòng tái tổ hợp DBN01-T và DBN04-T được phân cắt bởi AscI và BamHI, ScaI và SpeI tương ứng được cài vào vector biểu hiện DBNBC-01 để thu được vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100031. Phân cắt và giải trình tự cho thấy rằng các trình tự nucleotit trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100031 bao gồm các trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 6 trong danh mục trình tự, tức là: trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và trình tự nucleotit Vip3A, mà có thể liên kết với trình tự khởi đầu Ubi và trình tự kết thúc Nos.

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

Các vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014, DBN100013, DBN100075, DBN100276, DBN100015, DBN100030, DBN100012 và DBN100031 được tạo ra chính xác được biến nạp vào agrobacteria LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT: 18313-015) bằng phương pháp nitor lỏng. Các điều kiện biến nạp là: đặt 100µL agrobacteria LBA4404 và 3µL ADN plasmit (vector biểu hiện tái tổ hợp) trong nitor lỏng trong 10 phút, và bể nước ấm 37°C trong 10 phút; nuôi cấy agrobacteria LBA4404 đã biến nạp trong ống thử nghiệm LB, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C và tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ, phủ dung dịch nuôi cấy lên đĩa LB chứa 50mg/L Rifampixin và 100mg/L Kanamycin cho đến khi đơn dòng dương tính phát triển, lấy đơn dòng để nuôi cấy và chiết plasmit, sau đó sử dụng các enzym giới hạn endonucleaza AhdI và XhoI để phân cắt và đánh giá vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014, DBN100013, DBN100012, DBN100075, DBN100015 và

DBN100030, và sử dụng endonucleaza giới hạn AhdI và EcoRV để phân cắt và đánh giá vector biểu hiện tái tổ hợp DBN100031 và DBN100276. Các kết quả chỉ ra rằng các cấu trúc của vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014, DBN100013, DBN100075, DBN100276, DBN100015, DBN100030, DBN100012 và DBN100031 là chính xác hoàn toàn.

Ví dụ 3: Tạo ra và đánh giá cây ngô được biến nạp gen Cry 1F

1. Tạo ra cây ngô được biến nạp gen Cry 1F

Theo phương pháp nhiễm agrobacteria thông thường, các phôi non được nuôi cấy vô trùng của giống ngô Zong31 (Z31) và agrobacteria trong mục 3 của ví dụ 2 được đồng nuôi cấy để chuyển T-ADN (bao gồm trình tự khởi đầu của gen Ubiquitin ở cây ngô, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, trình tự nucleotit Cry 1Ab, trình tự nucleotit Vip3A, gen PMI và trình tự kết thúc Nos) trong vector biểu hiện tái tổ hợp DBN10014, DBN100013, DBN100075 và DBN100276 được tạo ra theo mục 2 của ví dụ 2 vào bộ nhiễm sắc thể cây ngô và thu được cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A. Đồng thời sử dụng cây ngô kiểu dại làm đối chứng.

Đối với sự biến nạp cây ngô qua trung gian agrobacterium, đơn giản là, tách các phôi non chưa trưởng thành khỏi cây ngô và cho các phôi non tiếp xúc với huyền phù agrobacteria, trong đó agrobacteria có thể chuyển trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và/hoặc trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A vào ít nhất là một tế bào của một trong số các phôi (bước 1: bước lây nhiễm). Trong bước này, tốt hơn là các phôi non lây nhiễm trong huyền phù agrobacteria ($OD_{660}=0,4-0,6$, môi trường lây nhiễm (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 68,5g/L, glucoza 36g/L, axetosyringon (AS) 40mg/L, axit 2,4-dichlorophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, pH5,3)) để bắt đầu lây nhiễm. Các phôi non và agrobacteria được đồng nuôi cấy trong một khoảng thời gian (3 ngày) (bước 2: bước đồng nuôi cấy). Tốt hơn là, sau bước lây nhiễm, các phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 20g/L, glucoza 10g/L, axetosyringon (AS)

100mg/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, thạch 8g/L, pH 5,8); sau giai đoạn đồng nuôi cấy này, có thể tiến hành bước “thu hồi” chọn lọc. Trong bước “thu hồi”, môi trường thu hồi (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 30g/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, thạch 8g/L, pH=5,8) chứa ít nhất là một kháng sinh (cephalosporin) được biết đến là ức chế sự phát triển của agrobacteria, và không bổ sung chất chọn lọc cây biến nạp (bước 3: bước thu hồi). Tốt hơn là, các phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn chứa kháng sinh, nhưng không chứa chất chọn lọc, để loại agrobacteria và tạo ra giai đoạn thu hồi các tế bào đã bị nhiễm. Sau đó, các phôi non đã bị nhiễm được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa chất chọn lọc (manoza) và chọn lọc mô sẹo đã biến nạp phát triển (bước 4: bước chọn lọc). Tốt hơn là, các phôi non được nuôi cấy trên môi trường rắn sàng lọc chứa chất chọn lọc (muối MS 4,3g/L, vitamin MS, casein 300mg/L, sucroza 5g/L, manoza 12,5g/L, axit 2,4-diclophenoxyaxetic (2,4-D) 1mg/L, thạch 8g/L, pH5,8), dẫn đến sự phát triển chọn lọc của các tế bào đã biến nạp. Sau đó, mô sẹo được tái sinh thành cây (bước 5: bước tái sinh). Tốt hơn là, mô sẹo phát triển trên môi trường chứa chất chọn lọc được nuôi cấy trên môi trường rắn (môi trường biệt hóa MS và môi trường sinh rễ MS) để tái sinh cây.

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

2. Sử dụng TaqMan để đánh giá cây ngô đã biến nạp gen Cry 1F

100mg lá được lấy từ cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A tương ứng làm các mẫu. ADN bộ gen của chúng được chiết bằng kit Qiagen

DNeasy Plant Maxi. Số bản sao của gen Cry 1F, gen Cry 1Ab và gen Vip3A được phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang sử dụng mẫu dò Taqman. Trong khi đó, các cây ngô kiểu dại được sử dụng làm đối chứng. Việc phát hiện và phân tích được tiến hành theo phương pháp trên. Thử nghiệm này được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình của chúng.

Số bản sao của gen Cry 1F, gen Cry 1Ab và gen Vip3A được phát hiện bằng phương pháp sau:

Bước 11: Cân 100mg lá của cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, cây ngô đã biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A và cây ngô kiểu dại tương ứng, nghiền chúng bằng nitor lỏng thành dung dịch đồng nhất trong cối tương ứng, và tiến hành bước trên ba lần đối với mỗi mẫu.

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

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

Bước 14: Điều chỉnh nồng độ ADN bộ gen của các mẫu nêu trên đến cùng một giá trị nồng độ. Khoảng giá trị nồng độ là 80-100ng/μl;

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

Các đoạn mồi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry 1Fa-01:

Đoạn mồi 1 (CF1): CAGTCAGGAAGTACAGTTGTAAGAGGG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 10 trong danh mục trình tự;

Đoạn mồi 2 (CR1): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 11 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 1 (CP1): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 12 trong danh mục trình tự;

Các đoạn môi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry 1Fa-02:

Đoạn môi 3 (CF2): CAGTCAGGAACTACAGTTGTAAGAGGG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 13 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 4 (CR2): ACGCGAATGGTCCTCCACTAG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 14 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 2 (CP2): CGTCGAAGAATGTCTCCTCCCGTGAAC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 15 trong danh mục trình tự;

Các đoạn môi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Cry 1Ab:

Đoạn môi 5 (CF3): CGAACTACGACTCCCGCAC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 16 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 6 (CR3): GTAGATTTCGCGGGTCAGTTG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 17 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 3 (CP3): CTACCCGATCCGCACCGTGTCC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 18 trong danh mục trình tự;

Các đoạn môi và mẫu dò dưới đây được sử dụng để phát hiện trình tự nucleotit Vip3A:

Đoạn môi 7 (VF1): ATTCTCGAAATCTCCCCTAGCG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 19 trong danh mục trình tự;

Đoạn môi 8 (VR1): GCTGCCAGTGGATGTCCAG như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 20 trong danh mục trình tự;

Mẫu dò 4 (VP1): CTCCTGAGCCCCGAGCTGATTAACACC như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 21 trong danh mục trình tự;

Hệ phản ứng PCR:

Jump Start™ Taq Ready Mix™ (Sigma)	10μl
------------------------------------	------

Hỗn hợp 50×đoạn môi/mẫu dò	1μl
----------------------------	-----

ADN bộ gen	3μl
------------	-----

Nước (ddH ₂ O)	6μl
---------------------------	-----

Hỗn hợp 50×đoạn môi/mẫu dò chứa 45μl mỗi đoạn môi ở nồng độ bằng 1mM, 50μl mẫu dò 100μM và 860μl dung dịch đệm 1×TE và được bảo quản trong

ống thí nghiệm màu hồ phách ở nhiệt độ 4°C.

Các điều kiện của phản ứng PCR:

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

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

Các kết quả thử nghiệm chỉ ra rằng trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đều được đưa vào bộ nhiễm sắc thể của cây ngô được phát hiện, và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đều thu được cây ngô chuyển gen chứa một bản sao của gen Cry 1F, gen Cry 1Ab và/hoặc gen Vip3A.

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

Phát hiện tác dụng trừ sâu chống lại *Prodenia litura* của cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A, cây ngô kiểu dại và cây ngô không chuyển gen như được xác định bằng Taqman.

Các lá mới (lá ở phía trong) được lấy từ cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A, cây ngô kiểu dại và cây ngô không chuyển gen như được xác định bằng Taqman (các giai đoạn V3-V4) tương ứng và rửa bằng nước vô trùng. Nước trên lá được thấm khô bằng gạc. Sau đó các gân của lá cây ngô được loại bỏ và lá được cắt thành các dải dài có kích thước 1cm×4cm. Hai dải lá được đặt trên giấy lọc ở đáy của đĩa nuôi cấy bằng nhựa hình tròn. Giấy lọc được làm ẩm

bằng nước cất. 10 con côn trùng *Pest Prodenia lituras* được nuôi nhân tạo (ấu trùng mới nở) được đặt vào mỗi đĩa nuôi cấy. Các đĩa nuôi cấy có côn trùng được đặt lại và sau đó được đặt vào trong hộp vuông có gác ẩm ở đáy hộp và để yên trong 3 ngày trong các điều kiện 26-28°C, độ ẩm tương đối 70%-80% và giai đoạn quang kỳ (sáng/tối) 16:8. Dựa trên ba chỉ số: quá trình phát triển và tỷ lệ chết của ấu trùng *Prodenia litura* và tỷ lệ phá hoại lá, thu được tổng số điểm kháng: Tổng số điểm kháng = $100 \times \text{tỷ lệ chết} + [100 \times \text{tỷ lệ chết} + 90 \times (\text{số ấu trùng mới nở} / \text{tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm}) + 60 \times (\text{số ấu trùng mới nở} - \text{số côn trùng trong đối chứng âm} / \text{tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm}) + 10 \times (\text{số côn trùng trong đối chứng âm} / \text{tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm})] + 100 \times (1 - \text{tỷ lệ phá hoại lá})$. Có ba giống (S1, S2 và S3) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, 3 giống (S4, S5 và S6) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, 3 giống (S7, S8 và S9) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, 3 giống (S10, S11 và S12) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A, một giống được xác định bởi Taqman là không chuyển gen (NGM1) và giống kiểu dại (CK1); ba cây được chọn từ mỗi giống để tiến hành thí nghiệm và mỗi cây được thí nghiệm sáu lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 1 và FIG.4.

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

Cây trồng	Tỷ lệ phá hoại lá (%)	Quá trình phát triển <i>Prodenia litura</i> (một giống)			Tình trạng chết của <i>Prodenia litura</i> (một giống)		Tổng số điểm (một giống)	Tổng số điểm trung bình
		Mới nở	Mới nở – đối chứng âm	≥ Đối chứng âm	Tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm	Tỷ lệ chết (%)		
S1	11,7	1	2,7	0	10	63	240	246
S2	16,7	1,7	1	0	10	73	251	
S3	11,7	1,7	1,6	0	10	67	247	
S4	2	0,3	0,7	0	10	90	285	276
S5	8,3	1	1	0	10	80	267	
S6	5	0	1,3	0	10	87	277	
S7	2	2	0,3	0	10	77	272	262
S8	6,7	1,7	1,3	0	10	70	256	
S9	2,3	1	2	0	10	70	259	
S10	0,3	0	0	0	10	100	300	300
S11	0,3	0	0	0	10	100	300	
S12	0,3	0	0	0	10	100	300	

NGM1	100	0	2	8	10	0	20	20
CK1	100	0	0	10	10	0	10	10

Các kết quả trong bảng 1 chỉ ra rằng: tổng số điểm của cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A trong thử nghiệm sinh học đều đạt được điểm số bằng khoảng hoặc trên 250 điểm, và một vài cây trong số chúng có thể đạt được điểm số tối đa bằng 300 điểm; trong khi đó, tổng số điểm của cây ngô không chuyển gen được xác định bởi Taqman và cây ngô kiểu dại trong thử nghiệm sinh học nói chung đạt được điểm số bằng khoảng 15 điểm.

Các kết quả trong FIG.4 chỉ ra rằng: so với cây ngô kiểu dại, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A có thể gây chết hàng loạt ấu trùng *Prodenia litura* mới nở trong vòng ba ngày và ức chế đáng kể quá trình phát triển của một tỷ lệ nhỏ ấu trùng sống sót. 3 ngày sau đó, ấu trùng về cơ bản ở giai đoạn mới nở. Ngoài ra, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A về cơ bản chỉ bị phá hoại nhẹ và tỷ lệ phá hoại lá là khoảng hoặc dưới 10%. Ngoài ra, nếu thử nghiệm sinh học kéo dài năm ngày, thì toàn bộ ấu trùng đều bị chết.

Do đó, đã chứng minh được rằng cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đều có hoạt tính cao chống lại *Prodenia litura* và hoạt tính này đủ để tạo ra tác dụng có hại đối với sự phát triển của *Prodenia litura*, để kiểm soát loài côn trùng này.

Ví dụ 5: Tạo ra và đánh giá cây đậu tương được biến nạp gen Cry 1F

1. Tạo ra cây đậu tương được biến nạp gen Cry 1F

Theo phương pháp lây nhiễm thông qua vi khuẩn *agrobacteria* thông thường,

các mô nốt lá mầm được nuôi cấy vô trùng của giống đậu tương ZHONGHUANG 13 và vi khuẩn agrobacteria trong mục 3 của ví dụ 2 được đồng nuôi cấy để chuyển T-ADN (bao gồm trình tự khởi đầu của gen Ubiquitin ở cây ngô, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, trình tự nucleotit Cry 1Ab, trình tự nucleotit Vip3A, gen PAT và trình tự kết thúc Nos) trong vectơ biểu hiện tái tổ hợp DBN100015, DBN100030, DBN100012 và DBN100031 được tạo ra theo mục 2 của ví dụ 2 vào bộ nhiễm sắc thể của cây đậu tương và tạo ra cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A. Đồng thời sử dụng các cây đậu tương kiểu dại làm đối chứng.

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

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

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

16 giờ và sau đó trồng ở nhiệt độ 20°C trong 8 giờ mỗi ngày.

2. Sử dụng TaqMan để đánh giá cây đậu tương được biến nạp gen Cry 1F

100mg lá được lấy từ cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A tương ứng làm các mẫu. ADN bộ gen của nó được chiết bằng kit Qiagen DNeasy Plant Maxi. Số bản sao của gen Cry 1F, gen Cry 1Ab và gen Vip3A được phát hiện bằng phương pháp PCR định lượng huỳnh quang sử dụng mẫu dò Taqman. Trong khi đó, cây đậu tương kiểu dại được sử dụng làm đối chứng. Phát hiện và phân tích được tiến hành theo phương pháp nêu trên sử dụng TaqMan để đánh giá cây ngô được biến nạp gen Cry 1F ở mục 2 của ví dụ 3. Thử nghiệm được lặp lại ba lần và lấy giá trị trung bình của chúng.

Các kết quả thử nghiệm cho thấy rằng trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đều được đưa vào bộ nhiễm sắc thể của cây đậu tương được phát hiện, và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đều tạo ra cây đậu tương chuyển gen chứa một bản sao của gen Cry 1F, gen Cry 1Ab và/hoặc gen Vip3A.

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

Phát hiện tác dụng trừ sâu chống lại *Prodenia litura* của cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A, cây đậu tương kiểu dại và cây đậu tương không chuyển gen như được xác định bởi Taqman.

Lá mới được lấy ra từ cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A, cây đậu tương kiểu dại và cây đậu tương

không chuyển gen như được xác định bởi Taqman (giai đoạn ba lá) tương ứng và rửa bằng nước vô trùng. Nước trên lá được thấm khô bằng gạc. Sau đó lá được cắt thành hình vuông có kích thước 2cm×2cm. Lá đã cắt có hình vuông được đặt trên giấy lọc ở đáy của đĩa nuôi cấy bằng nhựa hình tròn. Giấy lọc được làm ẩm bằng nước vô trùng. 10 con côn trùng gây hại *Prodenia lituras* được nuôi nhân tạo (ấu trùng mới nở) được đặt vào mỗi đĩa nuôi cấy. Các đĩa nuôi cấy có côn trùng được đậy và sau đó được đặt vào hộp hình vuông có gạc ẩm ở đáy hộp và để trong 3 ngày trong các điều kiện 26-28°C, RH 70%-80% và quang kỳ (sáng/tối) 16:8. Dựa trên ba chỉ số: quá trình phát triển và tỷ lệ chết của ấu trùng *Prodenia litura* và tỷ lệ phá hoại lá, thu được tổng số điểm kháng: tổng số điểm = $100 \times \text{tỷ lệ chết} + [100 \times \text{tỷ lệ chết} + 90 \times (\text{số ấu trùng mới nở} / \text{tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm}) + 60 \times (\text{số ấu trùng mới nở} - \text{số côn trùng ở đối chứng âm} / \text{tổng số ấu trùng dùng lây nhiễm}) + 10 \times (\text{số côn trùng ở nhóm đối chứng âm} / \text{tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm})] + 100 \times (1 - \text{tỷ lệ phá hoại lá})$. Có ba giống (S13, S14 và S15) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, 3 giống (S16, S17 và S18) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, 3 giống (S19, S20 và S21) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, 3 giống (S22, S23 và S24) được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3, giống được xác định bởi Taqman là không chuyển gen (NGM2) và giống kiểu dại (CK2); ba cây được chọn từ mỗi giống để tiến hành thử nghiệm và mỗi cây được thử sáu lần. Các kết quả được thể hiện trong bảng 2 và FIG.5.

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

Cây trồng	Tỷ lệ phá hoại lá (%)	Quá trình phát triển của <i>Prodenia litura</i> (một giống)			Trường hợp chết của <i>Prodenia litura</i> (một giống)		Tổng số điểm (một giống)	Tổng số điểm trung bình
		Mới nở	Mới nở – Đối chứng âm	≥ đối chứng âm	Tổng số ấu trùng dùng để lây nhiễm	Tỷ lệ chết (%)		
S13	23,3	0	3,3	0,7	10	60	217	225
S14	10	0	1,7	1,3	10	70	242	
S15	21,7	0	4	0,3	10	56	215	
S16	13,3	0	1,7	0,3	10	80	257	262
S17	20	0,7	2	0,3	10	70	239	
S18	3,3	0,7	0	0	10	93	289	

S19	1,7	0,3	0	0	10	97	295	
S20	0	0,3	0	0	10	97	297	297
S21	0	0	0	0	10	100	300	
S22	0	0	0	0	10	100	300	
S23	0	0	0	0	10	100	300	300
S24	0	0	0	0	10	100	300	
NG M2	75	0	1	9	10	0	40	40
CK2	70	0	0	10	10	0	40	40

Các kết quả trong bảng 2 chỉ ra rằng: tổng điểm của cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A trong các thử nghiệm sinh học đều đạt được điểm số khoảng hoặc trên 220 điểm, và một vài cây trong số chúng có thể đạt đến điểm số tối đa là 300 điểm; trong khi đó, tổng điểm của cây đậu tương không chuyển gen được xác định bởi Taqman và cây đậu tương kiểu dại trong thử nghiệm sinh học này nói chung là đạt được điểm số quanh 40 điểm.

Các kết quả trong FIG.5 chỉ ra rằng: so với cây đậu tương kiểu dại, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01 và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02 có thể gây chết hàng loạt ấu trùng *Prodenia litura* mới nở và ức chế đáng kể quá trình phát triển của một phần nhỏ ấu trùng sống sót. 3 ngày sau, ấu trùng về cơ bản ở giai đoạn mới nở-đối chứng âm. Tỷ lệ phá hoại lá là khoảng 20%. Tác dụng kiểm soát của cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đối với ấu trùng mới nở là gần 100%. Ấu trùng sống sót với tỷ lệ cực nhỏ về cơ bản dừng phát triển và lá chỉ bị phá hoại nhẹ giống dạng lỗ rất nhỏ.

Do đó, đã chứng minh được rằng cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A đều có hoạt tính cao chống lại *Prodenia litura* và hoạt tính này đủ để tạo ra tác dụng có hại đến sự phát triển của *Prodenia litura*, để kiểm soát nó.

Các kết quả thử nghiệm trên đây cũng chỉ ra rằng cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab, cây ngô được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-02, cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Cry 1Ab và cây đậu tương được biến nạp trình tự nucleotit Cry 1Fa-01-Vip3A có thể kiểm soát *Prodenia litura* rõ ràng do bản thân chúng có thể tạo ra protein Cry 1F. Do đó, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng dựa trên tác dụng gây độc này của protein Cry 1F đối với *Prodenia litura*, cây chuyển gen có thể tạo ra protein Cry 1F biểu hiện tương tự có thể được sử dụng để kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura*. Protein Cry 1F theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự axit amin nhất định của protein Cry 1F theo các phương án. Trong khi đó, cây chuyển gen cũng có thể tạo ra ít nhất là một protein trừ sâu loại thứ hai khác biệt với protein Cry 1F, như: protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.

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

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

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura*, trong đó côn trùng gây hại *Prodenia litura* ít nhất tiếp xúc với protein Cry 1Fa, protein Cry 1Fa tồn tại trong tế bào cây trồng chuyển gen ít nhất tạo ra protein Cry 1Fa, và côn trùng gây hại *Prodenia litura* ít nhất tiếp xúc với protein Cry 1Fa nhờ ăn tế bào cây trồng.
2. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 1, trong đó protein Cry 1Fa tồn tại trong cây trồng chuyển gen ít nhất tạo ra protein Cry 1Fa, côn trùng gây hại *Prodenia litura* ít nhất tiếp xúc với protein Cry 1Fa nhờ ăn các mô của cây trồng chuyển gen, và sự phát triển của côn trùng gây hại *Prodenia litura* được ức chế và/hoặc côn trùng gây hại *Prodenia litura* chết sau khi tiếp xúc, để kiểm soát được sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng.
3. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 1 hoặc 2, trong đó cây trồng này được chọn từ ngô, đậu tương, bông, khoai lang, khoai sọ, sen, cây điền thanh, thuốc lá, củ cải đường, bắp cải và cà tím.
4. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 3, trong đó cây chuyển gen có thể ở giai đoạn phát triển bất kỳ.
5. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 3, trong đó các mô của cây chuyển gen được chọn từ lá, thân, cò, cụm hoa cái, bao phấn, chỉ nhị và quả.
6. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 3, trong đó việc kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng không bị thay đổi theo sự thay đổi địa điểm trồng.
7. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 3, trong đó việc kiểm soát sự gây hại của *Prodenia litura* đối với cây trồng không bị thay đổi theo sự thay đổi thời điểm trồng.
8. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 3, trong đó bước trước bước tiếp xúc là trồng cây trồng chứa polynucleotit mã hóa

protein Cry 1Fa.

9. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 8, trong đó trình tự axit amin của protein Cry 1Fa bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
10. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 9, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.
11. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 9, trong đó cây trồng cũng chứa ít nhất là một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa.
12. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 11, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.
13. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 12, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.
14. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 13, trong đó trình tự nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.
15. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 11, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế gen quan trọng ở côn trùng và sâu bọ đích.
16. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 1 hoặc 2, trong đó trình tự axit amin của protein Cry 1Fa bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.
17. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 16, trong đó trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa bao gồm trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.
18. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 16, trong đó cây trồng cũng chứa ít nhất một trình tự nucleotit thứ hai khác biệt với

trình tự nucleotit mã hóa protein Cry 1Fa.

19. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 18, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein trừ sâu loại Cry, protein trừ sâu loại Vip, chất ức chế proteaza, lectin, α -amylaza hoặc peroxidaza.
20. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 19, trong đó trình tự nucleotit thứ hai mã hóa protein Cry 1Ab, protein Cry 1Ac, protein Cry 1Ba hoặc protein Vip3A.
21. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 20, trong đó trình tự nucleotit thứ hai có trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO: 5 hoặc SEQ ID NO: 6.
22. Phương pháp kiểm soát côn trùng gây hại *Prodenia litura* theo điểm 11, trong đó trình tự nucleotit thứ hai là dsARN ức chế một gen quan trọng ở côn trùng và sâu bọ đích.

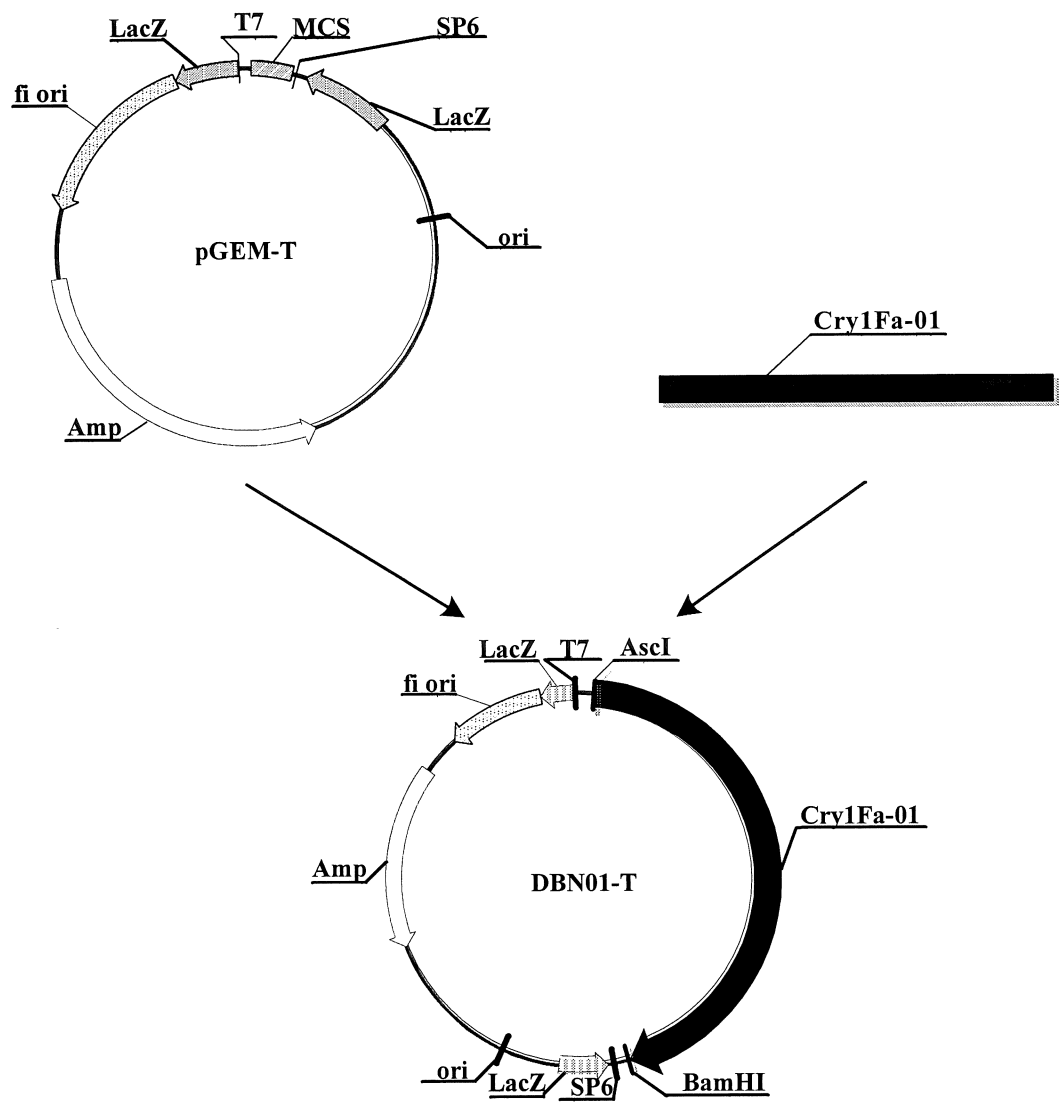


Fig.1

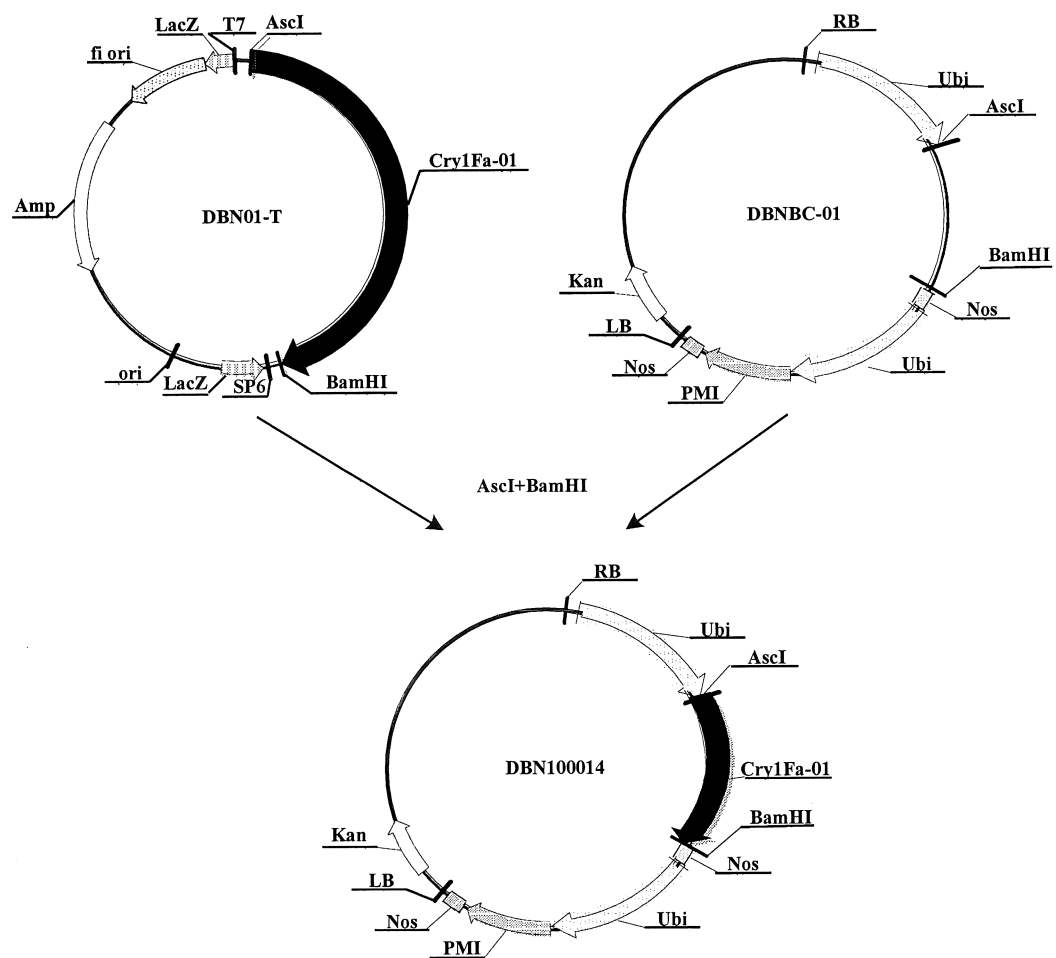


Fig.2

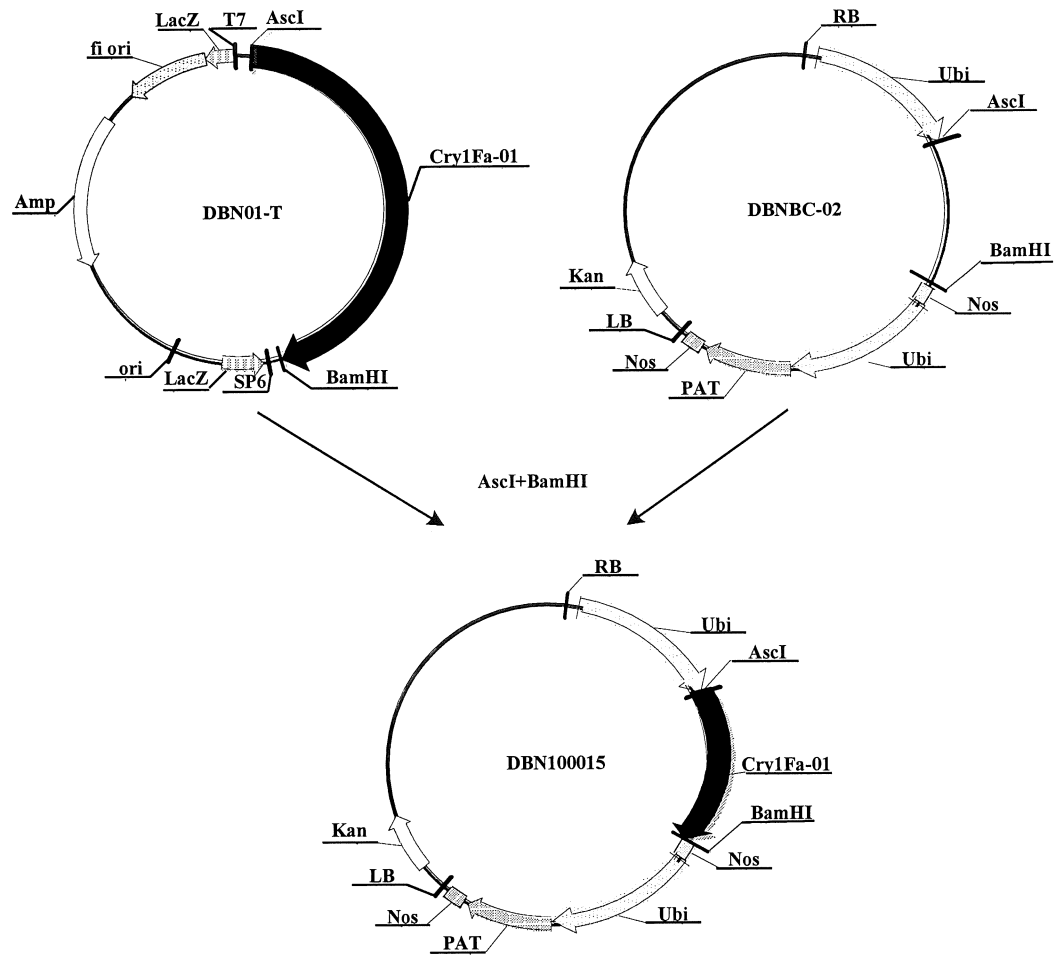


Fig.3

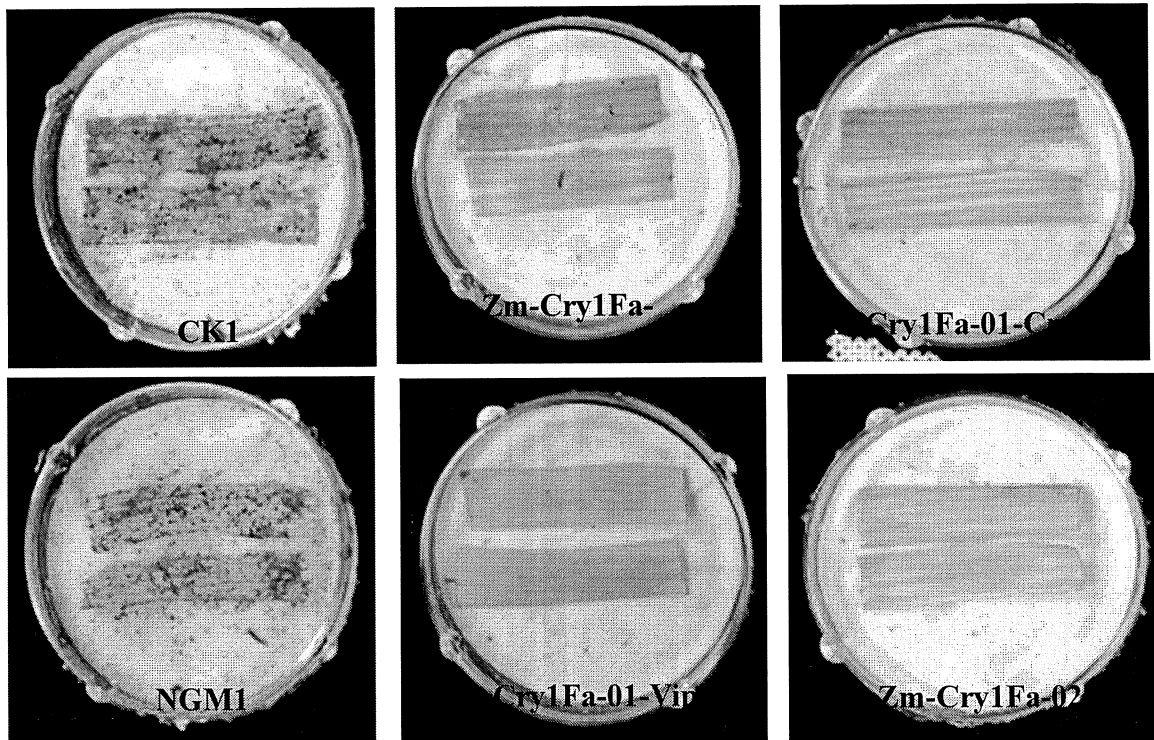


Fig.4

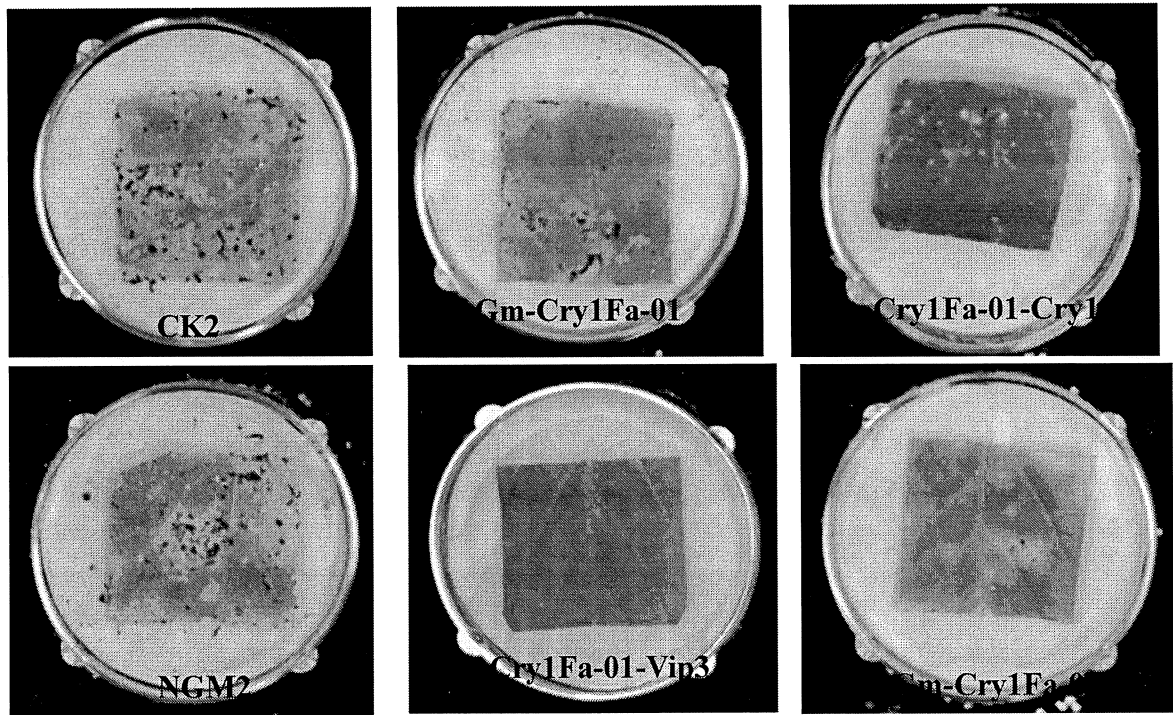


Fig.5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

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

<130> DBNBC34

<160> 22

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 605

<212> PRT

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin Cry1Fa-01

<400> 1

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Phe Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
 145 150 155 160

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
 165 170 175

Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
 180 185 190

Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
 195 200 205

Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
 210 215 220

Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
 225 230 235 240

Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
 245 250 255

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
 260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
 275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
 290 295 300

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
 305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
 325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
 340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
 355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln

370

375

380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
 405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
 420 425 430

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
 435 440 445

Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
 450 455 460

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
 465 470 475 480

Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
 485 490 495

Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
 500 505 510

Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
 515 520 525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
 530 535 540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
 545 550 555 560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
 565 570 575

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
 580 585 590

Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu
 595 600 605

```
<210> 2
<211> 1148
<212> PRT
<213> trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Trình tự axit amin Cry1Fa-02

<400> 2

Met Glu Asn Asn Ile Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu Asn
1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Glu Ile Leu Asn Glu Glu Arg Ser Thr Gly Arg Leu
20 25 30

Pro Leu Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Arg Leu Leu Leu Ser Glu Phe
35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Ala Phe Gly Leu Phe Asp Leu Ile Trp Gly
50 55 60

Phe Ile Thr Pro Ser Asp Trp Ser Leu Phe Leu Leu Gln Ile Glu Gln
65 70 75 80

Leu Ile Glu Gln Arg Ile Glu Thr Leu Glu Arg Asn Arg Ala Ile Thr
85 90 95

Thr Leu Arg Gly Leu Ala Asp Ser Tyr Glu Ile Tyr Ile Glu Ala Leu
100 105 110

Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175

Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
180 185 190

Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
 195 200 205

Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
 210 215 220

Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
 225 230 235 240

Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
 245 250 255

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
 260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
 275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
 290 295 300

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
 305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
 325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
 340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
 355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
 370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
 385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
 405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro

39010

420	425	430																							
Gly	Glu	Ile	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Trp	Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp										
		435					440					445													
Thr	His	Arg	Ser	Ala	Thr	Pro	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Pro	Glu	Arg	Ile										
	450					455					460														
Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr										
465					470					475					480										
Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr										
				485					490					495											
Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Ala	Tyr	Thr	Ile	Val	Asn	Ile	Asn	Gly	Gln	Leu										
			500					505					510												
Pro	Gln	Arg	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu										
		515					520					525													
Arg	Ile	Tyr	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe										
	530					535					540														
Asn	Lys	Thr	Met	Asp	Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser										
545					550					555					560										
Tyr	Ala	Thr	Ile	Asn	Thr	Ala	Phe	Thr	Phe	Pro	Met	Ser	Gln	Ser	Ser										
				565					570					575											
Phe	Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile										
			580					585					590												
Asp	Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu	Ala	Glu	Ser										
		595					600					605													
Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser										
	610					615					620														
Asn	Gln	Ile	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp	Val	Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Arg										
625					630					635					640										
Val	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu										
			645						650					655											

Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp
 660 665 670
 Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln
 675 680 685
 Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly
 690 695 700
 Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp
 705 710 715 720
 Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu
 725 730 735
 Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln
 740 745 750
 Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val
 755 760 765
 Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro
 770 775 780
 Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 785 790 795 800
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 805 810 815
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 820 825 830
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 835 840 845
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr
 850 855 860
 Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 865 870 875 880
 Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile

885

890

895

His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 900 905 910

Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu
 915 920 925

Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val
 930 935 940

Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys
 945 950 955 960

Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val
 965 970 975

Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro
 980 985 990

Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly
 995 1000 1005

Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1010 1015 1020

Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn
 1025 1030 1035

Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu
 1040 1045 1050

Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu
 1055 1060 1065

Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu
 1070 1075 1080

Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn
 1085 1090 1095

Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr
 1100 1105 1110

Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu
 1115 1120 1125

Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu
 1130 1135 1140

Leu Leu Met Glu Glu
 1145

<210> 3
 <211> 1818
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự nucleotit Cry1Fa-01

<400> 3
 atggagaaca acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tcctgaagta 60
 gagattctca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
 acacgtttcc tgttgtctga gtttgttcca ggtgtgggag ttgcgtttgg cctcttcgac 180
 ctcatctggg gcttcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag 240
 ttgattgaac aaaggattga gaccttgga aggaatcggg ccatcactac ccttcgtggc 300
 ttagcagaca gctatgagat ctacattgaa gcactaagag agtgggaagc caatcctaac 360
 aatgcccac tgagagaaga tgtgcgtata cgctttgcta acacagatga tgctttgatc 420
 acagccatca acaacttcac ccttaccagc ttcgagatcc ctcttctctc ggtctatgtt 480
 caagctgcta acctgcactt gtcactactg cgcgacgctg tgtcgttttg gcaagggttg 540
 ggactggaca tagctactgt caacaatcac tacaacagac tcatcaatct gattcatcga 600
 tacacgaaac attgtttgga tacctacaat cagggattgg agaacctgag aggtactaac 660
 actcgccaat gggccagggt caatcagttc aggagagacc ttacacttac tgtgttagac 720
 atagttgctc tctttccgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgattcaaac gtcatcccaa 780
 cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgccaacata 840
 cccaatgggt tcaacagggc tgagtttgga gtcagaccac cccatctcat ggacttcatg 900
 aactctttgt ttgtgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgtgggg aggacactta 960
 gttagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaactttc ctagttacgg ggtcttcaat 1020
 cccgggggcg ccatctggat tgcagatgaa gatccacgtc ctttctatcg gaccttgtca 1080

gatcctgtct togtccgagg aggccttggc aatcctcact atgtactcgg tcttagggga 1140
gtggcctttc aacaaactgg tacgaatcac acccgcacat tcaggaactc cgggaccatt 1200
gactctctag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg caccttggaa tgactactcc 1260
catgtgctga atcatgttac ctttgtgcgc tggccagggtg agatctcagg ttccgactca 1320
tggagagcac caatgttctc ttggacgcat cgtagcgcta cccccacaaa caccattgat 1380
ccagagagaa tcaactcagat tcccttggtg aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca 1440
gttgtaagag ggccgggggtt cacgggagga gacattcttc gacgcactag tggaggacca 1500
ttcgcgta caattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggtatcg tgccaggata 1560
cgctatgcct ctactaccaa tctaagaatc tacgttacgg ttgcagggtga acggatcttt 1620
gctggtcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatccac ttacattcca atctttctcc 1680
tacgccacta tcaacaccgc gttcaccttt ccaatgagcc agagcagttt cacagtaggt 1740
gctgatacct tcagttcagg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gattccagtt 1800
actgccacac tcgagtaa 1818

<210> 4

<211> 3447

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit CrylFa-02

<400> 4

atggagaaca acatacagaa tcagtgcgtc ccctacaact gcctcaacaa tcctgaagta 60
gagattctca acgaagagag gtcgactggc agattgccgt tagacatctc cctgtccctt 120
acacgtctcc tgttgtctga gtttgttcca ggtgtgggag ttgcgtttg cctcttcgac 180
ctcatctggg gttcatcac tccatctgat tggagcctct ttcttctcca gattgaacag 240
ttgattgaac aaaggattga gaccttggaa aggaatcggg ccatcactac ccttcgtggc 300
ttagcagaca gctatgagat ctacattgaa gactaagag agtggaagc caatcctaac 360
aatgcccac tgagagaaga tgtgcgtata cgctttgcta acacagatga tgctttgatc 420
acagccatca acaacttcac ccttaccagc ttcgagatcc ctcttctctc ggtctatgtt 480
caagctgcta acctgcactt gtcactactg cgcgacgctg tgctgtttg gcaagggttg 540
ggactggaca tagctactgt caacaatcac tacaacagac tcatcaatct gattcatcga 600
tacacgaaac attgtttgga tacctacaat cagggttgagg agaacctgag aggtactaac 660

actcgccaat gggccaggtt caatcagttc aggagagacc ttacacttac tgtgttagac	720
atagttgctc tctttccgaa ctacgatgtt cgtacctatc cgattcaaac gtcattccaa	780
cttacaaggg agatctacac cagttcagtc attgaagact ctccagtttc tgcgaacata	840
cccaatgggt tcaacagggc tgagtttgga gtcagaccac cccatctcat ggacttcatg	900
aactctttgt ttgtgactgc agagactgtt agatcccaaa ctgtgtgggg aggacactta	960
gttagctcac gcaacacggc tggcaatcgt atcaactttc ctagttacgg ggtcttcaat	1020
cccgggggcg ccatctggat tgcagatgaa gatccacgtc ctttctatcg gaccttgtca	1080
gacctgtct tctccgagg aggctttggc aatcctcact atgtactcgg tcttagggga	1140
gtggcctttc acaaaactgg tacgaatcac acccgccatc tcaggaactc cgggaccatt	1200
gactctctag atgagatacc acctcaagac aacagcggcg caccttggaa tgactactcc	1260
catgtgctga atcatgttac ctttgtgctc tggccaggtg agatctcagg ttccgactca	1320
tggagagcac caatgttctc ttggacgcat cgtagcgcta cccccacaaa caccattgat	1380
ccagagagaa tctctcagat tcccttgggt aaggcacaca cacttcagtc aggaactaca	1440
gttgtaagag ggccgggggt cacgggagga gacattcttc gacgcactag tggaggacca	1500
ttcgcgtaca ccattgtcaa catcaatggg caacttcccc aaaggatcgt tgccaggata	1560
cgctatgcct ctactaccaa tctaagaatc tacgttacgg ttgcaggtga acggatcttt	1620
gctggtcagt tcaacaagac aatggatacc ggtgatccac ttacattcca atctttctcc	1680
tacgccacta tcaacaccgc gttcaccttt ccaatgagcc agagcagttt cacagtaggt	1740
gctgatacct tcagttcagg caacgaagtg tacattgaca ggtttgagtt gattccagtt	1800
actgccacac tcgaggcaga gtctgacttg gaaagagcac agaaggcgggt gaatgctctg	1860
ttcacttcgt ccaatcagat tgggctcaag acagatgtga ctgactatca catcgatcgc	1920
gtttccaacc ttgttgagtg cctctctgat gagttctgtt tggatgagaa gaaggagttg	1980
tccgagaagg tcaaaccatgc taagcgactt agtgatgagc ggaacttgct tcaagatccc	2040
aactttcgcg ggatcaacag gcaactagat cgtggatgga ggggaagtac ggacatcacc	2100
attcaaggag gtgatgatgt gttcaaggag aactatgtta cgctcttggg tacctttgat	2160
gagtgctatc caacatacct gtaccagaag atagatgaat cgaaactcaa agcctacaca	2220
agataccagt tgagaggta catcgaggac agtcaagacc ttgagatcta cctcatcaga	2280
tacaacgcca aacatgagac agtcaatgtg cctgggacgg gttcactctg gccactttca	2340
gccccaaagtc ccatcggcaa gtgtgccccat cactcacacc acttctcctt ggacatagac	2400

gttggctgta cgcacctgaa cgaagacctc ggtgtgtggg tgatcttcaa gatcaagact 2460
 caagatggcc atgccaggct aggcaatctg gagtttctag aagagaaacc acttgttgga 2520
 gaagccctcg ctagagtgaag gagggctgag aagaagtgga gggacaagag agagaagttg 2580
 gaatgggaaa caaacattgt gtacaaagaa gccaaagaaa gcgttgacgc tctgtttgtg 2640
 aactctcagt atgataggct ccaagctgat accaacaatag ctatgattca tgctgcagac 2700
 aaacgcgttc atagcattcg ggaagcttac cttcctgaac ttagcgtgat tccgggtgtc 2760
 aatgctgcta tctttgaaga gttagaaggg cgcattctca ctgcattctc cttgtatgat 2820
 gcgaggaatg tcatcaagaa tgggtgacttc aacaatggcc tatcctgctg gaatgtgaaa 2880
 gggcacgtag atgtagaaga acagaacaat caccgctctg tccttgttgt tcctgagtgg 2940
 gaagcagaag tttcacaaga agttcgtgtc tgccttggtc gtggctacat tcttcgtgtt 3000
 accgcgtaca aagaaggata cggagaaggc tgcgtcacca tacacgagat tgagaacaac 3060
 accgacgagc tgaagttcag caactgcgtc gaggaggaag tctacccaaa caacaccgta 3120
 acttgcaatg actacactgc gactcaagag gagtatgagg gtacttacac ttctcgcaat 3180
 cgaggatacg atggagccta tgagagcaac tcttctgtac ccgctgacta tgcattcagcc 3240
 tatgaggaga aggcttacac cgatggacgt agggacaatc cttgcgaatc taacagaggc 3300
 tatggggact acacaccgtt accagccggc tatgtcacca aagagttaga gtactttcca 3360
 gaaaccgaca aggtttggat tgagattgga gaaacggaag gaacattcat tgttgatagc 3420
 gtggagttac ttctgatgga ggaatga 3447

<210> 5

<211> 2457

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit Cry1Ab

<400> 5

atggacaaca acccaaacat caacgagtgat atcccgtaca actgcctcag caaccctgag 60
 gtcgaggtgc tcggcgggtga gcgcacgag accggttaca ccccatcga catctccctc 120
 tccctcacgc agttcctgct cagcgagttc gtgccaggcg ctggcttcgt cctgggcctc 180
 gtggacatca tctggggcat ctttggcccc tcccagtggg acgccttcct ggtgcaaatc 240
 gagcagctca tcaaccagag gatcgaggag ttgccagga accaggccat cagccgcctg 300
 gagggcctca gcaacctcta ccaaattctac gctgagagct tccgcgagtg ggaggccgac 360

cccactaacc cagctctccg cgaggagatg cgcattccagt tcaacgacat gaacagcgcc	420
ctgaccaccg ccatcccact cttcgccgtc cagaactacc aagtcccgtc cctgtccgtg	480
tacgtccagg ccgccaacct gcacctcagc gtgctgaggg acgtcagcgt gtttggccag	540
aggtggggct tcgacgccgc caccatcaac agccgctaca acgacctcac caggctgac	600
ggcaactaca ccgaccacgc tgtccgctgg tacaactctg gcctggagcg cgtctggggc	660
cctgattcta gagactggat tcgctacaac cagttcaggc gcgagctgac cctcaccgtc	720
ctggacattg tgtccctctt cccgaactac gactcccgc cctaccgat ccgcaccgtg	780
tcccaactga cccgcgaaat ctacaccaac cccgtcctgg agaacttcga cggtagcttc	840
aggggcagcg ccaggggcat cgagggtcc atcaggagcc cacacctgat ggacatcctc	900
aacagcatca ctatctacac cgatgcccac cgcggcgagt actactggtc cggccaccag	960
atcatggcct ccccggtcgg cttcagcggc cccgagttta ctttctctct ctacggcacg	1020
atgggcaacg ccgctccaca acaacgcac gtcgctcagc tggggccagg cgtctaccgc	1080
accctgagct ccaccctgta ccgcaggccc ttcaacatcg gtatcaacaa ccagcagctg	1140
tccgtcctgg atggcactga gttcgccctac ggcacctcct ccaacctgcc ctccgctgtc	1200
taccgcaaga gcggcacggt ggattccctg gacgagatcc caccacagaa caacaatgtg	1260
ccccccaggc agggtttttc ccacaggctc agccacgtgt ccatgttccg ctccggcttc	1320
agcaactcgt ccgtgagcat catcagagct cctatgttct cctggattca tcgcagcgcg	1380
gagttcaaca atatcattcc gtccctccaa atcacccaaa tccccctcac caagtccacc	1440
aacctgggca gcggcacctc cgtggtgaag ggcccaggct tcacggggcg cgacatcctg	1500
cgcaggacct ccccgggcca gatcagcacc ctccgcgtca acatcacgc tccctgtcc	1560
cagaggtacc gcgtcaggat tcgctacgct agcaccacca acctgcaatt ccacacctcc	1620
atcgacggca ggccgatcaa tcagggtaac ttctccgcca ccatgtccag cggcagcaac	1680
ctccaatccg gcagcttccg caccgtgggt ttaccacccc ccttcaactt ctccaacggc	1740
tccagcgttt tcacctgag cgcacacgtg ttcaattccg gcaatgaggt gtacattgac	1800
cgcattgagt tcgtgccagc cgaggtcacc ttccaagccg agtacgacct ggagagagcc	1860
cagaaggctg tcaatgagct cttcacgtcc agcaatcaga tcggcctgaa gaccgacgtc	1920
actgactacc acatcgacca agtctccaac ctcggtggagt gcctctccga tgagttctgc	1980
ctcgacgaga agaaggagct gtccgagaag gtgaagcatg ccaagcgtct cagcgacgag	2040
aggaatctcc tccaggaccc caatttccgc ggcattcaaca ggcagctcga ccgcggctgg	2100

cgcggcagca ccgacatcac gatccagggc ggcgacgatg tgttcaagga gaactacgtg 2160
 actctcctgg gcacttttca cgagtgtctac cctacctact tgtaccagaa gatcgatgag 2220
 tccaagctca aggcttacac tcgctaccag ctccgcgggt acatcgaaga cagccaagac 2280
 ctcgagattt acctgatccg ctacaacgcc aagcacgaga ccgtcaacgt gcccggtact 2340
 ggttccctct ggccgctgag cgccccagc ccgatcggca agtgtgcca ccacagccac 2400
 cacttctcct tggacatcga tgtgggctgc accgacctga acgaggactt tcggtag 2457

<210> 6

<211> 2370

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự nucleotit Vip3A

<400> 6

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

gagatttcta acgactcaat tacctgtctg aaggtctacg aggcgaagct caagcagaat 1140
 tatcaagtgg acaaggattc tctgtcagag gttatctacg gcgacatgga taagctgctt 1200
 tgccctgato agtccgagca aatctactat acgaacaata ttgtcttccc caacgaatac 1260
 gtgatcacca agattgactt tacgaagaag atgaagacac tccggtacga ggtgacggct 1320
 aacttctatg attcgtctac gggcgagatc gacctcaaca agaagaaggt cgaatcatcc 1380
 gaggccgaat acagaaccct gtcggcgaac gacgatggcg tgtatatgcc tcttggggtc 1440
 atttctgaga ccttcctcac gcccatcaat ggctttgggc tccaggcaga tgagaactcc 1500
 cgctgatca cccttacgtg caagagctac ctcagggagc tgctgcttgc caccgacctc 1560
 tctaacaagg aaacgaagct gatcgttccg ccatcaggct tcatctccaa tattgtggag 1620
 aacgggtcaa ttgaggaaga taatctggaa ccgtggaagg ctaacaataa gaacgcatac 1680
 gttgaccaca caggcggggg gaatggcact aaggcgctct atgtgcataa ggatggtggc 1740
 atctcccagt tcattggcga caagctgaag ccgaagacag aatacgtgat tcaatatact 1800
 gtgaagggca agccaagcat ccacctcaag gatgagaaca cagggtacat ccattacgaa 1860
 gatactaaca acaacctgga ggactaccag acaatcaata agaggttcac aactggcact 1920
 gacctgaagg gggctctatct tattctcaag tcccagaatg gcgatgaggc ctggggcgac 1980
 aacttcatca ttctcgaaat ctcccctagc gagaagctcc tgagccccga gctgattaac 2040
 accaataact ggacatccac tggcagcacg aatatctcgg ggaacaccct gacgctttac 2100
 cagggcggga gaggcattct gaagcagaac ctccaactgg attcgttctc tacctacaga 2160
 gtctatTTTT cagtttccgg cgacgcgaat gtgcgcacat ggaactcgcg ggaagtcctc 2220
 ttcgagaaga gatacatgtc tggcgctaag gatgtgtcag aaatgttcac cacgaagttt 2280
 gagaaggaca acttttatat cgaactgtcc caagggaata acctctacgg cggccccatt 2340
 gttcattttt acgacgtgag catcaagtga 2370

<210> 7
 <211> 1992
 <212> ADN
 <213> ngô

<400> 7
 ctgcagtgca gcgtgacccg gtcgtgcccc tctctagaga taatgagcat tgcattgtcta 60
 agttataaaa aattaccaca tatttttttt gtcacacttg tttgaagtgc agtttatcta 120
 tctttataca tatatttaaa ctttactcta cgaataatat aatctatagt actacaataa 180
 tatcagtgtt ttagagaatc atataaatga acagtttagac atgggtctaaa ggacaattga 240

gtattttgac	aacaggactc	tacagtttta	tcttttttagt	gtgcatgtgt	tctccttttt	300
ttttgcaa	at agcttcac	ct atataata	ct tcatccatt	t tattagtag	aca tccatttag	360
gttttaggg	tt aatggtttt	tt atagactaa	tt ttttttag	ta catctatttt	tt attctatttt	420
agcctctaa	aa ttaagaaa	ac taaaactct	aa ttttagttt	tt tttatttaa	tt aatttagata	480
taaaataga	aa taaaataaa	ag tgactaaaa	aa ttaaacaat	ac acccttta	ag aaattaaaaa	540
aactaagg	aa acatttttt	ct tgtttcgag	tt agataatg	cc agcctgtta	aa acgcgcgtc	600
cgagtcta	ac ggacacca	ac cagcgaacc	aa gcagcgtcg	gc gtcggggcc	aa gcgaagcaga	660
cggcacgg	ca tctctgtcg	gc tgcctctgg	aa cccctctcg	aa gagttccgc	ct ccaccgttg	720
acttgctcc	g ctgtcggca	t ccagaaatt	g cgtggcggg	ag cggcagacg	tt gagccggcac	780
ggcaggcgg	gc ctctcctcc	ct tctcacggc	aa cggcagct	ac gggggattc	ct tttcccacc	840
ctccttcg	ct ttccttcct	ct cgcccgcct	gt aataaatag	aa caccctctc	ct acaccctct	900
tccccaac	ct cgtgttg	ttc ggagcgc	aa cacaaca	ac cagatctcc	ct ccaaatcc	960
ccgtcggc	ac ctccgcttc	aa aggtacgc	cg ctcgctcc	ct cccccccc	ct ctctctac	1020
tctctagat	gc ggcgttc	cg ggttcggt	aa tccatgg	tt gggcccggt	aa gttctact	1080
tgtgttag	at ccgtgttt	gt gtttagat	cc cgtgtct	ag gttcgtac	aa ggatgcgac	1140
tgtacgtc	ag acacgttc	ct gattgcta	act tgccagt	gtt tctcttt	gg gaatcctgg	1200
atggctct	ag ccgttccg	ca gacgggat	cc cgtatgc	at ttttttt	gtt tcgttgc	1260
gggtttgg	tt tgcccttt	ct ctttatt	tc atatatgc	cg tgcacttg	tt tgtcgggt	1320
tcttttcat	g ctttttttt	tg tcttggt	gt gatgatgt	gg tctgggt	gg cggtcgttc	1380
agatcgg	ag agaattct	gt ttcaaact	ac ctggtgg	att tattaat	ttt ggatctgt	1440
gtgtgtgc	ca tacatatt	ca tagttac	gaa ttgaaga	tga tggatgg	aaa tatcgat	1500
ggataggt	at acatgttg	at ggcgggt	ttt ctgatg	ca tacagaga	tg ctttttgt	1560
gcttggtt	gt gatgatgt	gg tgtgggt	ggg cggtcgt	tca ttcggttc	tag atcggagt	1620
aatactgt	ttt caaact	ac cctgtatt	ta ttaatttt	gg aactgtat	gt gtgtgtca	1680
catcttc	ata gttacg	agtt taagat	ggat ggaata	tc atctagg	ata ggtatac	1740
ttgatgt	ggg ttttact	gat gcatata	cat gatggc	atat gcagca	tcta ttcatat	1800
ctaacct	ga gtacctat	ctt attata	ataa acaagt	atgt tttata	atta ttttgat	1860
gatatact	tg gatgatgg	ca tatgcag	cag ctatat	gttgg attttt	tttag cctgc	1920
atacgct	att tatttg	cttg gtactg	ttt ttgtcg	at gctcacc	ctg ttgtttg	1980

ttactttctgc ag

1992

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

<400> 8
 gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctggtgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

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

<400> 9
 atgcaaaaac tcattaactc agtgcaaaaac tatgcctggg gcagcaaaaac ggcgttgact 60
 gaactttatg gtatggaaaa tccgtccagc cagccgatgg ccgagctgtg gatgggcgca 120
 catccgaaaa gcagttcacg agtgcagaat gccgccggag atatcgtttc actgcgtgat 180
 gtgattgaga gtgataaatc gactctgctc ggagaggccg ttgccaaaacg ctttggcgaa 240
 ctgcctttcc tgttcaaagt attatgcgca gcacagccac tctccattca ggttcatcca 300
 aacaaacaca attctgaaat cggttttgcc aaagaaaatg ccgcaggtat cccgatggat 360
 gccgccgagc gtaactataa agatcctaac cacaagccgg agctggtttt tgcgctgacg 420
 cctttccttg cgatgaacgc gtttcgtgaa ttttccgaga ttgtctccct actccagccg 480
 gtcgcaggtg cacatccggc gattgctcac tttttacaac agcctgatgc cgaacgttta 540
 agcgaactgt tcgccagcct gttgaatatg caggggtgaag aaaaatcccc cgcgctggcg 600
 atttttaaat cggccctcga tagccagcag ggtgaaccgt ggcaaacgat tcgtttaatt 660
 tctgaatttt acccggaaga cagcggctctg ttctccccgc tattgctgaa tgtggtgaaa 720
 ttgaaccctg gcgaagcgat gttcctgttc gctgaaacac cgcacgctta cctgcaaggc 780
 gtggcgctgg aagtgatggc aaactccgat aacgtgctgc gtgcgggtct gacgcctaaa 840
 tacattgata ttccggaact ggttgccaat gtgaaattcg aagccaaacc ggctaaccag 900
 ttgttgaccc agccggtgaa acaaggtgca gaactggact tcccgattcc agtggatgat 960

tttgcccttct cgctgcatga ccttagtgat aaagaaacca ccattagcca gcagagtgcc 1020
gccattttgt tctgcgtcga aggcgatgca acgttggtgga aagggttctca gcagttacag 1080
cttaaaccgg gtgaatcagc gtttattgcc gccaacgaat caccggtgac tgtcaaaggc 1140
cacggccggtt tagcgcggtgt ttacaacaag ctgtaa 1176

<210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 1

<400> 10
cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg 27

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 2

<400> 11
acgcgaatgg tcctccacta g 21

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

<220>
<223> mẫu dò 1

<400> 12
cgtcgaagaa tgtctcctcc cgtgaac 27

<210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo

<220>
<223> đoạn mỗi 3

<400> 13
cagtcaggaa ctacagttgt aagaggg 27

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 4

<400> 14
 acgcgaatgg tcctccacta g

21

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

<220>
 <223> mẫu dò 2

<400> 15
 cgtcgaagaa tgtctcctcc cgtgaac

27

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 5

<400> 16
 cgaactacga ctcccgcac

19

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

<220>
 <223> đoạn mỗi 6

<400> 17
 gtagatttcg cgggtcagtt g

21

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

<220>
 <223> mẫu dò 3

<400> 18
 ctaccgatc cgcaccgtgt cc

22

<210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 7

<400> 19
 attctcgaat tctcccctag cg

22

<210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> đoạn mỗi 8

<400> 20
 gctgccagt gatgtccag

19

<210> 21
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo

<220>
 <223> mẫu dò 4

<400> 21
 ctccctgagcc ccgagctgat taacacc

27

<210> 22
 <211> 552
 <212> ADN
 <213> streptomyces viridis

<400> 22
 atgtctccgg agaggagacc agttgagatt aggccagcta cagcagctga tatggccgcg
 gtttgtgata tcgttaacca ttacattgag acgtctacag tgaacttttag gacagagcca
 caaacaccac aagagtggat tgatgatcta gagagggttg aagatagata cccttggttg
 gttgctgagg ttgaggggtgt tgtggctggt attgcttacg ctgggccctg gaaggctagg
 aacgcttacg attggacagt tgagagtact gtttacgtgt cacataggca tcaaagggttg
 ggccctaggat ccacattgta cacacatttg cttaagtcta tggaggcgca aggttttaag
 tctgtgggttg ctgttatagg ccttccaaac gatccatctg ttaggttgca tgaggctttg

60

120

180

240

300

360

420

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