



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁷ A01H 1/06; C12N 15/82; C12N 5/00; (13) B
C12N 15/00



1-0042497

-
- (21) 1-2015-03839 (22) 14/03/2014
(86) PCT/US2014/029621 14/03/2014 (87) WO 2014/144987 A3 18/09/2014
(30) 61/801,320 15/03/2013 US
(45) 27/01/2025 442 (43) 27/06/2016 339A
(73) 1. CIBUS US LLC (US)
6455 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121, United States of America
2. CIBUS EUROPE B.V. (NL)
Goessestraatweg 19, NL-CH4421 AD Kapelle, Netherlands
(72) BEETHAM, Peter, R. (AU); GOCAL, Gregory, F.W. (CA); SCHOPKE, Christian
(DE); SAUER, Noel, Joy (US); PEARCE, James (US); SEGAMI, Rosa, E. (US);
MOZORUK, Jerry (US).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)
-

- (54) PHƯƠNG PHÁP ĐƯA ĐỘT BIẾN DO OLIGONUCLEOBAZƠ SỬA CHỮA GEN
(GRON) GÂY RA VÀO TRÌNH TỰ ADN ĐÍCH TRONG TẾ BÀO THỰC VẬT

(21) 1-2015-03839

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp đưa đột biến do oligonucleobazơ sửa chữa gen gây ra vào trình tự ADN đích của tế bào thực vật trong tế bào. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến thực vật, tế bào thực vật và hạt giống chứa dạng cải biến hệ gen thu được bằng phương pháp này và phương pháp đánh giá hiệu quả chuyển hóa của oligonucleobazơ sửa chữa gen này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nhìn chung, sáng chế này đề cập đến các phương pháp mới để cải thiện hiệu quả của việc hướng đích các cải biến đến các vị trí cụ thể trong trình tự nucleotit hệ gen hoặc các trình tự nucleotit khác. Hơn thế nữa, sáng chế còn đề cập đến ADN đích đã được cải biến, được gây đột biến hoặc được đánh dấu theo phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này. Sáng chế còn đề cập đến các tế bào, mô, và sinh vật đã được cải biến theo các phương pháp theo sáng chế.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc làm đứt sợi đôi ADN (DNA double-strand breaking - DSB) làm tăng mức độ tái tổ hợp tương đồng trong các tế bào sống và đã được khai thác để biên tập hệ gen hướng đích nhờ sử dụng endonucleaza được xử lý bằng công nghệ. Thành phần chính yếu của nucleaza được xử lý bằng công nghệ là miền nhận biết ADN có khả năng dẫn hướng nucleaza đến vị trí đích của hệ gen để có được sự đứt sợi đôi ADN của bộ gen. Việc sửa chữa DSB tế bào do quá trình nối liền đầu tận cùng không tương đồng (nonhomologous end-joining - NHEJ) tạo ra các đoạn xóa bỏ/các đoạn chèn gây đột biến của gen đích. Theo cách khác, DSB có thể tạo ra quá trình tái tổ hợp tương đồng giữa ổ gen đích nội sinh và đoạn ADN tương đồng đã được đưa vào theo cách ngoại sinh có thông tin di truyền mong muốn, một quy trình được gọi là công nghệ hướng đích gen.

Phương pháp có triển vọng nhất liên quan đến gen hoặc công nghệ biên tập hệ gen là nucleaza lõi kẽm (zinc finger nuclease - ZFN) được thiết kế theo yêu cầu, một loại enzym lai bao gồm các miền liên kết ADN của các protein lõi kẽm và miền nucleaza FokI (FokI nuclease - FN). Công nghệ ZFN chủ yếu liên quan đến cách sử dụng các protein lai được tạo ra từ các miền liên kết ADN của protein lõi kẽm (ZF) và miền phân cắt không đặc hiệu của endonucleaza FokI. Các ZF có thể được lắp ráp ở dạng môđun được thiết kế theo yêu cầu để nhận biết các trình tự ADN được chọn sau khi liên kết ở vị trí được chọn trước, DSB được tạo ra nhờ tác dụng của miền phân cắt của FokI.

Trước tiên, endonucleaza FokI phân lập được từ vi khuẩn *Flavobacterium okeanoikoites*. Nucleaza loại IIS này bao gồm hai miền tách biệt, miền liên kết ADN đầu tận cùng N và miền phân cắt ADN đầu tận cùng C. Miền liên kết ADN hoạt động để nhận biết trình tự không lặp đối xứng 5'-GGATG-375'-CATCC-3' trong khi miền xúc tác phân cắt ADN sợi đôi bằng cách không đặc hiệu ở khoảng cách cố định là 9 và 13 nucleotit nằm sau của vị trí nhận biết. FokI tồn tại ở dạng monome không có hoạt tính trong dung dịch và trở thành một dimer có hoạt tính sau khi liên kết với ADN đích của nó và khi có mặt một số kim loại hóa trị hai. Là một phức hợp chức năng, hai phân tử của FokI thì mỗi phân tử liên kết với một phân tử ADN sợi đôi dimer hóa thông qua miền xúc tác của ADN để có được sự phân cắt hữu hiệu các sợi đôi ADN.

Theo cách tương tự, cũng có thể tạo ra nucleaza bằng cách sử dụng các protein/các miền khác nếu chúng có khả năng nhận biết ADN đặc hiệu. Các chất hiệu ứng TAL thuộc về một nhóm lớn gồm các protein của vi khuẩn tồn tại ở các chủng khác nhau của *Xanthomonas* và được chuyển vị vào các tế bào chủ bằng hệ thống tiết loại III, loại được gọi là các chất hiệu ứng loại III. Một khi ở trong các tế bào chủ, một số chất hiệu ứng TAL được phát hiện là hoạt hóa được theo cách phiên mã các gen đích chủ tương ứng của chúng để có được độc tính của chúng (khả năng gây bệnh) hoặc tình trạng phi độc tính (khả năng tạo ra các đáp ứng đề kháng của vật chủ) phụ thuộc vào tình trạng gen của vật chủ. Mỗi chất hiệu ứng chứa các motif định vị nhân chức năng và miền hoạt hóa quá trình phiên mã công hiệu đặc trưng cho chất hoạt hóa quá trình phiên mã của sinh vật nhân thực. Và mỗi chất hiệu ứng còn chứa vùng lặp trung tâm bao gồm số lượng đơn vị lặp lại khác nhau của 34 axit amin, và vùng lặp lại này có vai trò là miền liên kết ADN quyết định tính đặc hiệu sinh học của mỗi chất hiệu ứng.

Tài liệu của Zhang và các đồng tác giả, *Plant Physiol.* 161: 20-27, 2013, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, bộc lộ cách sử dụng TALEN – nucleaza hiệu ứng giống chất hoạt hóa quá trình phiên mã – đây là endonucleaza được xử lý bằng công nghệ dựa trên sự kết hợp miền liên kết ADN giống chất hiệu ứng TAL với miền xúc tác của FokI. Bằng cách xử lý theo công nghệ miền liên kết ADN, các TALEN này được cho là có thể được chất hoạt hóa quá trình một cách dễ dàng để nhận biết các miền liên kết ADN đặc hiệu. Bằng cách sử dụng thể nguyên sinh thuốc lá làm hệ thống mô hình, hoạt tính TALEN được đánh giá bằng cách sử dụng chất chỉ thị polynucleotit gắn kết sợi đơn chứa trình tự

mã hóa protein huỳnh quang màu vàng được liên kết với vị trí nhận biết TALEN. Hệ thống chỉ thị này được phân phối đến thể nguyên sinh, và sự phân cắt-và-sửa chữa có thể đo được bằng mức độ biểu hiện YFP chức năng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp đưa đột biến do oligonucleobazo sửa chữa gen (GRON) gây ra vào trình tự axit deoxyribonucleic (ADN) đích trong tế bào thực vật. Các phương pháp này bao gồm, trong số các đối tượng khác, việc nuôi cấy tế bào thực vật trong các điều kiện làm tăng một hoặc nhiều quá trình sửa chữa ADN của tế bào trước khi, và/hoặc đồng thời với, việc phân phối GRON vào tế bào thực vật

Theo các phương án nhất định, các điều kiện làm tăng một hoặc nhiều quá trình sửa chữa ADN của tế bào bao gồm một hoặc nhiều bước trong số: đưa một hoặc nhiều vị trí vào GRON hoặc vào ADN của tế bào thực vật là đích đối với quá trình sửa chữa bằng cách cắt bỏ bazo, đưa một hoặc nhiều vị trí vào GRON hoặc vào ADN của tế bào thực vật là đích đối với quá trình nối liền đầu tận cùng không tương đồng, đưa một hoặc nhiều vị trí vào GRON hoặc vào ADN của tế bào thực vật là đích đối với quá trình nối liền đầu tận cùng do tính vi tương đồng gây ra, đưa một hoặc nhiều vị trí vào GRON hoặc vào ADN của tế bào thực vật là đích đối với quá trình tái tổ hợp tương đồng, và đưa một hoặc nhiều vị trí vào GRON hoặc vào ADN của tế bào thực vật là đích đối với quá trình sửa chữa bằng cách đẩy.

Theo các phương án nhất định, trình tự axit deoxyribonucleic (ADN) đích là trong hệ gen của tế bào thực vật. Tế bào thực vật này có thể thuộc loại không chuyển gen hoặc chuyển gen, và trình tự ADN đích có thể là gen chuyển hoặc gen nội sinh của tế bào thực vật.

Theo các phương án nhất định, các điều kiện làm tăng một hoặc nhiều quá trình sửa chữa ADN của tế bào bao gồm việc đưa một hoặc nhiều hợp chất gây ra sự đứt sợi ADN đơn hoặc sợi ADN kép vào tế bào thực vật trước khi hoặc đồng thời với việc phân phối GRON vào tế bào thực vật. Các hợp chất làm ví dụ được mô tả dưới đây.

Các phương pháp và chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được áp dụng cho các loài thực vật nói chung. Chỉ lấy làm ví dụ, các loài thực vật có thể được chọn từ nhóm bao gồm cải dầu, hướng dương, ngô, thuốc lá, củ cải đường, bông, ngô, lúa mì, lúa mạch, lúa gạo, cỏ linh lăng, lúa mạch, lúa miến, cà chua, xoài, đào, táo, lê, dâu tây, chuối, dưa tây, khoai tây, cà rốt, rau diếp, hành, đậu nành, mía, đậu Hà Lan, đậu gà, đậu Hà Lan nâu, đậu răng ngựa, đậu lăng, củ cải, củ cải Thụy Điển, cải Brussel, đậu cánh chim, súp lơ, cải xoăn, đậu răng ngựa, dương, thông, bạch đàn, nho, cây thuộc họ cam chanh, tiểu hắc mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, yến mạch, cỏ lớp đất mặt và cỏ làm thức ăn gia súc, lanh, cải dầu, cải cay, dưa chuột, bìm bịp, cây bóng nước, hồ tiêu, cà tím, cúc vạn thọ, sen, cải bắp, cúc, cẩm chướng, tulip, diên vĩ và huệ. Các phương pháp và chế phẩm này cũng có thể áp dụng toàn bộ hoặc một phần cho tất cả các hệ thống sinh học khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tế bào của vi khuẩn, tế bào của nấm và tế bào của động vật có vú và thậm chí các cơ quan tế bào của chúng (ví dụ, ty thể và lục lạp).

Theo các phương án nhất định, các phương pháp này còn bao gồm việc tái tạo thực vật có đột biến được đưa vào bằng GRON từ tế bào thực vật, và có thể bao gồm việc thu gom hạt giống từ thực vật.

Theo các khía cạnh có liên quan, sáng chế đề xuất các tế bào thực vật chứa dạng cải biến hệ gen được đưa vào bằng GRON theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, thực vật chứa dạng cải biến hệ gen được đưa vào bằng GRON theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, hoặc hạt giống chứa dạng cải biến hệ gen được đưa vào bằng GRON theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này.

Các phương án khác của sáng chế sẽ trở nên sáng tỏ nhờ phần mô tả một cách chi tiết, các phương án làm ví dụ và các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Sáng chế được hiểu theo các định nghĩa dưới đây.

Oligonucleobazơ là polyme của nucleobazơ, polyme này có thể lai theo phương pháp ghép cặp bazơ Watson-Crick với ADN có trình tự bổ trợ.

Nucleobazơ bao gồm một bazơ, bazơ này là purin, pyrimidin, hoặc dẫn xuất hoặc chất tương tự của nó. Nucleobazơ bao gồm nucleobazơ peptit, cấu trúc siêu phân tử của axit nucleic peptit, và nucleobazơ morpholin cũng như nucleosit và nucleotit. Nucleosit là nucleobazơ chứa gốc pentozafuranosyl, ví dụ, 2'-đeoxyribosit hoặc ribosit tùy ý được thế. Nucleosit có thể được liên kết bằng một gốc liên kết trong số một vài gốc liên kết, có thể chứa hoặc có thể không chứa phospho. Nucleosit được liên kết bằng liên kết phosphodiester không được thế được gọi là các nucleotit.

Chuỗi oligonucleobazơ có một đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' đơn lẻ, đây là nucleobazơ cuối cùng của polyme. Một chuỗi oligonucleobazơ cụ thể có thể chứa nucleobazơ thuộc tất cả các loại. Hợp chất oligonucleobazơ là hợp chất chứa một hoặc nhiều chuỗi oligonucleobazơ bổ trợ và được lai theo phương pháp ghép cặp bazơ Watson-Crick. Nucleobazơ là loại deoxyribo hoặc loại ribo. Nucleobazơ loại ribo là nucleobazơ chứa pentozafuranosyl trong đó cacbon 2' là metylen được thế bằng hydroxyl, alkyloxy hoặc halogen. Deoxynucleobazơ loại ribo là nucleobazơ không phải là nucleobazơ loại ribo và bao gồm tất cả nucleobazơ không chứa gốc pentozafuranosyl.

Nhìn chung, sợi oligonucleobazơ bao gồm cả chuỗi oligonucleobazơ và các đoạn hoặc các vùng của chuỗi oligonucleobazơ. Sợi oligonucleobazơ có đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5'. Khi một sợi oligonucleobazơ có cùng phạm vi kích thước với một chuỗi nào đó, thì đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5' của sợi cũng là đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5' của chuỗi này.

Theo sáng chế, cơ quan thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lá, thân, rễ, chồi, nụ hoa, mô phân sinh, phôi, lá mầm, nội nhũ, đài hoa, cánh hoa, nhụy hoa, lá noãn, nhị hoa, bao phấn, vi bào tử, phấn hoa, ống phấn, noãn, bầu nhụy và trái, hoặc các phần cắt, lát hoặc khoanh được lấy từ đó. Mô thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mô sẹ, mô cơ bản, mô mạch, mô dự trữ, mô phân sinh, mô lá, mô chồi, mô rễ, mô vú lá, mô khối u thực vật, và mô sinh sản. Các tế bào thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào phân lập được có thành tế bào, các dạng kết tụ có kích thước khác nhau của chúng, và thể nguyên sinh.

Hai polynucleotit hoặc polypeptit là đồng nhất nếu trình tự lần lượt của các nucleotit hoặc gốc axit amin trong hai trình tự này là giống hệt nhau khi được xếp thẳng hàng để có được mức tương ứng tối đa như được mô tả dưới đây. Các thuật ngữ “đồng nhất” hoặc “mức độ đồng nhất tính theo phần trăm”, trong ngữ cảnh về hai trình tự axit nucleic hoặc trình tự polypeptit trở lên, được dùng để chỉ hai trình tự hoặc nhiều hơn hai trình tự con giống hệt nhau hoặc có tỷ lệ phần trăm được chỉ ra của các gốc axit amin hoặc các nucleotit giống hệt nhau, khi được đem so sánh và được xếp thẳng hàng để có được mức tương ứng tối đa trên cửa sổ so sánh, như đo được bằng cách sử dụng một trong số các thuật toán so sánh trình tự dưới đây hoặc theo phương pháp xếp thẳng hàng thủ công và xem xét bằng mắt. Đối với các polypeptit trong đó các trình tự khác biệt về các dạng thay thế kiểu bảo toàn, mức độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm có thể được điều chỉnh lên để chỉnh sửa đối với tính chất thay thế có tính bảo toàn. Phương tiện để thực hiện sự điều chỉnh này được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Nói chung, điều này liên quan đến việc cho điểm dạng thay thế kiểu bảo toàn ở dạng hợp đôi một phần hơn là hợp đôi toàn bộ, nhờ đó làm tăng mức độ đồng nhất trình tự tính theo tỷ lệ phần trăm. Vì vậy, ví dụ, trường hợp một axit amin đồng nhất được cho điểm là 1 và dạng thay thế không bảo toàn được cho điểm là không, thì dạng thay thế kiểu bảo toàn được cho điểm là từ không đến 1. Phương pháp cho điểm các dạng thay thế kiểu bảo toàn được tính theo, ví dụ, thuật toán của Meyers & Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17 (1988) ví dụ, như được thực hiện trong chương trình PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA).

Các cụm từ “gần như đồng nhất”, và “mức độ đồng nhất tính theo phần trăm” trong ngữ cảnh về hai axit nucleic hoặc polypeptit, được dùng để chỉ các trình tự hoặc các trình tự con có mức độ đồng nhất gốc axit amin hoặc nucleotit ít nhất là 50%, thuận lợi là 60%, tốt hơn là 70%, thậm chí tốt hơn là 80%, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 90% đến 95% khi được xếp thẳng hàng để có được mức tương ứng tối đa trên cửa sổ so sánh như được đo bằng cách sử dụng một trong số các thuật toán so sánh trình tự dưới đây hoặc theo phương pháp xếp thẳng hàng thủ công và xem xét bằng mắt. Định nghĩa này cũng được dùng để chỉ bộ thể của trình tự thử nghiệm, bộ thể này có tính hỗ trợ trình tự hoặc trình tự con cơ bản khi trình tự thử nghiệm có mức độ đồng nhất cơ bản với trình tự tham chiếu.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận thấy rằng hai polypeptit cũng có thể là “gần như đồng nhất” nếu hai polypeptit này là tương đồng về miễn dịch học. Vì vậy, cấu trúc protein tổng thể có thể tương đồng trong khi cấu trúc bậc một của hai polypeptit này thể hiện sự thay đổi đáng kể. Do đó, phương pháp đo xem liệu hai polypeptit có gần như đồng nhất hay không liên quan đến việc đo khả năng liên kết của kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng với mỗi polypeptit. Hai polypeptit là gần như đồng nhất nếu các kháng thể đặc hiệu với polypeptit thứ nhất liên kết với polypeptit thứ hai với ái lực ít nhất bằng một phần ba của ái lực đối với polypeptit thứ nhất. Đối với việc so sánh trình tự, thông thường một trình tự đóng vai trò là trình tự tham chiếu, các trình tự thử nghiệm được đem so sánh với trình tự này. Khi sử dụng thuật toán so sánh trình tự, thì trình tự thử nghiệm và trình tự tham chiếu được nhập vào máy tính, tọa độ trình tự con được phân định, nếu cần, và các thông số của chương trình thuật toán về trình tự được phân định. Sau đó, thuật toán so sánh trình tự tính toán độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm của (các) trình tự thử nghiệm so với trình tự tham chiếu, dựa trên các thông số chương trình đã được phân định.

Việc xếp thẳng hàng tối ưu các trình tự dùng để so sánh có thể được thực hiện, ví dụ, bằng thuật toán về tính tương đồng cục bộ của Smith & Waterman, 0.4dv. Appl. Math. 2:482 (1981), bằng thuật toán xếp thẳng hàng về tính tương đồng của Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), theo phương pháp tìm kiếm tính tương đồng của Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 5 85:2444 (1988), bằng các xử lý thực hiện được vì tính hóa của các thuật toán này (GAP, BESTFIT, FASTA, và TFASTA trong Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), bằng phần mềm dùng để xếp thẳng hàng như VECTOR NTI phiên bản #6 của InforMax, Inc. MD, USA, bằng các quy trình được mô tả trong ClustalW, Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTALW: cải thiện tính nhạy cảm của phương pháp xếp thẳng hàng đa trình tự tăng dần thông qua việc lấy trọng số trình tự, các điểm phạt khoảng trống đặc hiệu với vị trí và chọn ma trận trọng số. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680 hoặc theo phương pháp xem xét bằng mắt (nhìn chung, xem tài liệu: *Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, một công ty liên doanh giữa Greene Publishing Associates, Inc. và John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Các ví dụ về thuật toán thích hợp để xác định mức độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm và tính tương đồng trình tự là thuật toán BLAST và thuật toán BLAST 2.0, các thuật toán này lần lượt được mô tả trong tài liệu: Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 và Altschul *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 25: 33 89-3402. Phần mềm để thực hiện phương pháp phân tích BLAST là có sẵn công khai thông qua National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Trước tiên, thuật toán này bao gồm bước nhận biết các cặp trình tự có điểm số cao (high scoring sequence pair - HSP) bằng cách nhận biết các từ ngắn có chiều dài W trong trình tự truy vấn, các từ này trùng khớp hoặc thỏa mãn một số điểm số ngưỡng T có trị số dương khi được xếp thẳng hàng với một từ nào đó có cùng chiều dài trong trình tự của cơ sở dữ liệu. T được gọi là ngưỡng điểm số từ lân cận (Altschul *et al.*, nêu trên). Các từ hit lân cận ban đầu này đóng vai trò là các hạt giống dùng để khởi đầu các hoạt động tìm kiếm nhằm tìm ra các HSP dài hơn chứa chúng. Sau đó, các từ hit được kéo dài theo cả hai chiều dọc theo mỗi trình tự trong chừng mực mà điểm số xếp thẳng hàng tích lũy có thể làm tăng được. Các điểm số tích lũy được tính bằng cách sử dụng, đối với trình tự nucleotit, các thông số M (điểm số thưởng của cặp gồm các gốc cặp đôi; luôn luôn > 0) và N (điểm số phạt của các gốc hợp đôi; luôn luôn < 0). Đối với các trình tự axit amin, ma trận cho điểm được sử dụng để tính điểm số tích lũy. Việc kéo dài các từ hit theo mỗi hướng được ngừng lại khi: điểm số xếp thẳng hàng tích lũy giảm xuống bằng lượng X từ trị số đạt được tối đa của nó; điểm số tích lũy về không hoặc nhỏ hơn không, do sự tích tụ của một hoặc nhiều dạng xếp thẳng hàng gốc có điểm số âm; hoặc đạt đến đầu của một trong hai trình tự. Các thông số thuật toán BLAST là W, T, và X xác định tính nhạy cảm và vận tốc của phương pháp xếp thẳng hàng. Chương trình BLASTN (dùng cho trình tự nucleotit) sử dụng ở dạng mặc định chiều dài (W) là 11, giá trị kỳ vọng (E) là 10, $M=5$, $N=-4$, và sự so sánh cả hai sợi. Đối với các trình tự axit amin, chương trình BLASTP sử dụng ở dạng mặc định chiều dài (W) là 3, giá trị kỳ vọng (E) là 10, và ma trận cho điểm BLOSUM62 (xem: Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)). Ngoài mức độ đồng nhất trình tự tính theo phần trăm, thuật toán BLAST cũng thực hiện phép phân tích thống kê về tính tương tự giữa hai trình tự (ví dụ, xem: Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Một số đo về tính tương tự do thuật toán BLAST đem lại là xác suất tổng nhỏ nhất ($P(N)$), số đo này đem lại chỉ báo về xác suất mà nhờ đó, hiện tượng cặp đôi giữa hai trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin thường xảy ra

một cách ngẫu nhiên. Ví dụ, axit nucleic được xem là tương đồng với trình tự tham chiếu nếu xác suất tổng nhỏ nhất trong phương pháp so sánh axit nucleic thử nghiệm với axit nucleic tham chiếu nhỏ hơn 0,1, thậm chí tốt hơn là nhỏ hơn 0,01, và tốt nhất là nhỏ hơn 0,001.

Làm đứt sợi

Việc đưa các hợp chất kích thích sự đứt sợi đơn hoặc sự đứt sợi đôi vào oligonucleotit hoặc cùng với oligonucleotit, tạo ra tổn thương được sửa chữa bằng quá trình nối liền đầu tận cùng không tương đồng (NHEJ), quá trình nối liền đầu tận cùng do tính vi tương đồng gây ra (MMEJ), và quá trình tái tổ hợp tương đồng. Lấy ví dụ, họ bleomycin của các chất kháng sinh, nucleaza lõi kẽm, FokI (hoặc nhóm loại IIS bất kỳ của enzym giới hạn) và các nucleaza khác có thể được liên kết cộng hóa trị với đầu tận cùng 3' hoặc đầu tận cùng 5' của các oligonucleotit sửa chữa, để đưa sự đứt sợi đôi vào vùng lân cận ở vị trí hướng đích dùng cho quá trình chuyển hóa bằng oligonucleotit sửa chữa. Họ bleomycin của các chất kháng sinh là glycopeptit phân cắt ADN bao gồm bleomycin, zeoxin, phleomycin, talytalsomycin, pepleomycin và các chất khác.

Các phương pháp theo sáng chế không chỉ giới hạn ở tính chất hoặc loại chất phản ứng cải biến ADN được dùng. Ví dụ, các chất phản ứng cải biến ADN này giải phóng các gốc gây ra sự đứt sợi ADN. Theo cách khác, các chất phản ứng alkyl hóa ADN để tạo các sản phẩm cộng thường phong bế quá trình sao chép và quá trình phiên mã. Theo một phương án thay thế khác, các chất phản ứng tạo ra các liên kết ngang hoặc các phân tử có tác dụng ức chế các enzym tế bào dẫn đến sự đứt sợi. Các ví dụ về các chất phản ứng cải biến ADN đã được liên kết với các oligonucleotit để tạo ra TFO bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, indolocarbazol, naphtalen diimide (NDI), transplatin, bleomycin, các chất tương tự của xyclopropapyroloindol, và phenanthrodihydrodioxin. Cụ thể là, indolocarbazol là chất ức chế topoisomeraza I. Quá trình ức chế các enzym này gây ra sự đứt sợi và tạo ra sản phẩm cộng protein ADN [Arimondo *et al.*, *Bioorganic and Medicinal Chem.* 8, 777, 2000]. NDI là chất oxy hóa nhờ ánh sáng có thể oxy hóa các guanin có thể gây ra các đột biến ở các vị trí của gốc guanin [Nunez, *et al.*, *Biochemistry*, 39, 6190, 2000]. Transplatin đã thể hiện là phản ứng được với ADN ở đích sợi xoắn ba khi TFO được liên kết với chất phản ứng này. Phản ứng này có thể gây ra sự tạo ra các

sản phẩm cộng ADN thường gây đột biến [Columbier, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 24: 4519, 1996]. Bleomycin là tác nhân gây đứt ADN, được sử dụng rộng rãi làm chất có tác dụng giống bức xạ. Nó đã được liên kết với các oligonucleotit và đã được thể hiện là có hoạt tính trong vai trò là tác nhân gây đứt ở dạng thức đó [Sergeyev, *Nucleic Acids Research* 23, 4400, 1995; Kane, *et al.*, *Biochemistry*, 34, 16715, 1995]. Các chất tương tự của xyclopropapyroloindol đã được liên kết với TFO và đã thể hiện là alkyl hóa được ADN trong trình tự đích sợi xoắn ba. Sau đó, ADN đã được alkyl hóa thường chứa các sản phẩm cộng hóa học thường gây đột biến [Lukhtanov, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 25, 5077, 1997]. Phenanthrođihydrođioxin là các quinon được nguy trang có tác dụng giải phóng các loại gốc sau khi hoạt hóa bằng ánh sáng. Chúng đã được liên kết với TFO và đã được thể hiện là đưa được các đoạn đứt vào ADN sợi xoắn kép khi hoạt hóa bằng ánh sáng [Bendinskas *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 9, 555, 1998].

Một chiến lược dùng để tạo ra sự phá vỡ gen hướng đích là thông qua việc tạo đoạn đứt ADN sợi đơn hoặc sợi đôi do endonucleaza đặc hiệu với vị trí gây ra. Endonucleaza thường được sử dụng nhất cho tình trạng phá vỡ gen hướng đích ở sinh vật có truyền thống là không dùng được với các phương pháp hướng đích gen thông thường hơn, như tảo, thực vật, và mô hình động vật lớn, trong đó có người. Ví dụ, hiện có các thử nghiệm lâm sàng trên người đang được tiến hành liên quan đến nucleaza lỗi kẽm dùng để điều trị và phòng bệnh nhiễm HIV. Hơn thế nữa, công nghệ xử lý endonucleaza hiện đang được sử dụng nhằm phá vỡ các gen tạo ra các kiểu không mong muốn ở cây trồng.

Endonucleaza tìm mục tiêu, còn được gọi là meganucleaza, là endonucleaza đặc hiệu với trình tự tạo ra sự đứt sợi đôi trong ADN của hệ gen với mức độ đặc hiệu cao do vị trí tách lớn của chúng (ví dụ, >14bp). Trong khi tính đặc hiệu của endonucleaza tìm mục tiêu đối với các vị trí đích của chúng cho phép hướng đích chính xác đoạn đứt ADN được kích thích, vị trí tách endonucleaza tìm mục tiêu là hiếm và xác suất tìm thấy vị trí tách có trong tự nhiên ở gen hướng đích là thấp.

Endonucleaza tìm mục tiêu được xử lý bằng công nghệ được tạo ra bằng cách cải biến tính đặc hiệu của endonucleaza tìm mục tiêu hiện có. Theo một phương pháp, các biến đổi được đưa vào trình tự axit amin của endonucleaza tìm mục tiêu có trong tự nhiên và sau đó, endonucleaza tìm mục tiêu được xử lý bằng công nghệ thu được sàng lọc để chọn

các protein chức năng phân cắt vị trí liên kết hướng đích. Theo một phương pháp khác, endonucleaza tìm mục tiêu thể khảm được xử lý bằng công nghệ bằng cách kết hợp các vị trí nhận biết của hai endonucleaza tìm mục tiêu khác nhau để tạo ra vị trí nhận biết mới bao gồm một nửa vị trí của mỗi endonucleaza tìm mục tiêu.

Một nhóm gồm các endonucleaza nhân tạo là endonucleaza lõi kẽm. Endonucleaza lõi kẽm kết hợp miền phân cắt không đặc hiệu, thường là miền phân cắt không đặc hiệu của endonucleaza FokI, với các miền protein lõi kẽm được xử lý bằng công nghệ để liên kết với các trình tự ADN đặc hiệu. Cấu trúc dạng mô đun của endonucleaza lõi kẽm làm cho chúng trở thành nền tảng đa năng để phân phối các đoạn đứt sợi đôi đặc hiệu với vị trí đến hệ gen. Một hạn chế của endonucleaza lõi kẽm là tính đặc hiệu thấp đối với vị trí đích hoặc sự có mặt của nhiều vị trí đích trong hệ gen có thể gây ra các sự phân cắt ngoài đích. Vì endonucleaza FokI phân cắt ở dạng dimer, một chiến lược nhằm phòng ngừa các sự phân cắt ngoài đích là thiết kế các miền lõi kẽm liên kết ở 9 vị trí cặp bazơ liên kề.

Các TALEN là nucleaza có thể hướng đích được sử dụng để kích thích sự đứt sợi đơn và sự đứt sợi đôi ở các vị trí ADN đặc hiệu, tiếp đó, vị trí này được sửa chữa bằng các cơ chế có thể khai thác để tạo ra các thay đổi trình tự ở vị trí tách.

Khối cấu thành cơ bản được sử dụng để xử lý bằng công nghệ vùng liên kết với ADN của TALEN là miền lặp lại được bảo toàn ở mức cao được tạo ra từ các TALE có trong tự nhiên được mã hóa bởi *Xanthomonas spp. proteobacteria*. Quá trình liên kết ADN bằng TALEN là do các mảng gồm các đơn vị lặp lại có 33 axit amin đến 35 axit amin được bảo toàn ở mức cao nằm bên sườn các miền được tạo ra bởi TALE bổ sung tại đầu tận cùng amin và đầu tận cùng cacboxy do các đơn vị lặp lại này gây ra.

Các đơn vị lặp lại TALE này liên kết đặc hiệu với một bazơ đơn lẻ của ADN, mức độ đồng nhất của chúng được xác định bằng hai gốc siêu biến thường được tìm thấy ở các vị trí 12 và 13 của đơn vị lặp lại này, số lượng đơn vị lặp lại trong một mảng tương ứng với chiều dài của axit nucleic đích mong muốn, mức độ đồng nhất của đơn vị lặp lại này được chọn để cặp với trình tự axit nucleic đích. Tốt hơn, nếu axit nucleic đích có 15 đến 20 cặp bazơ để tối đa hóa tính chọn lọc của vị trí đích. Sự phân cắt axit nucleic đích thường xảy ra trong phạm vi 50 cặp bazơ của quá trình liên kết TALEN. Chương trình

máy tính dùng để thiết kế vị trí nhận biết TALEN đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem tài liệu: Cermak *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2011 July; 39(12): e82.

Một khi được thiết kế để cặp với trình tự đích mong muốn, TALEN có thể được biểu hiện bằng cách tái tổ hợp và được đưa vào thể nguyên sinh với vai trò là protein ngoại sinh, hoặc được biểu hiện từ plasmid trong thể nguyên sinh này.

Cấu trúc GRON và việc đưa vào các tế bào thực vật

Oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp có thể được đưa vào tế bào thực vật bằng cách áp dụng phương pháp bất kỳ thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương tiện mang siêu nhỏ (phân phối bằng bắn phá sinh học), sợi siêu nhỏ (sợi mịn), biến nạp bằng xung điện, hấp thụ ADN trực tiếp và vi tiêm. Các ví dụ minh họa về một oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp được mô tả dưới đây.

Sáng chế có thể được thực hiện bằng oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp có hình thể và tính chất hóa học được mô tả trong patent Kmiec I và patent Kmiec II tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Kmiec I hướng dẫn phương pháp đưa các dạng thay đổi gen cụ thể vào gen đích. Oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp trong Kmiec I và/hoặc Kmiec II chứa hai sợi hỗ trợ, một trong số hai sợi này chứa ít nhất một đoạn của các nucleotit loại ARN (“đoạn ARN”) được ghép cặp bazơ với các nucleotit loại ADN của sợi kia.

Kmiec II bộc lộ các chất không nucleotitpurin chứa bazơ pyrimidin và purin có thể được dùng để thay thế cho các nucleotit. Các patent Mỹ số 5,756,325; 5,871,984; 5,760,012; 5,888,983; 5,795,972; 5,780,296; 5,945,339; 6,004,804; và 6,010,907 và trong đơn quốc tế số PCT/US00/23457; và trong các công bố đơn quốc tế số WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; WO 99/40789; US 6,870,075; và công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20030084473, mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, bộc lộ các phân tử tạo ra sự tái tổ hợp bổ sung có thể được sử dụng trong sáng chế này. Thuật ngữ “oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp” được sử dụng trong bản mô tả này để chỉ các phân tử có thể được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế và chứa các oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp, phân tử chứa chất không phải nucleotit

được đưa ra trong tài liệu: Kmiec II, các oligodeoxynucleotit sợi đơn và các phân tử tạo ra sự tái tổ hợp khác được đưa ra trong các patent và các công bố đơn nêu trên.

Theo một phương án, oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp là oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp trong đó các nucleotit loại ARN của oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp được làm cho kháng RNaza bằng cách thay thế 2'-hydroxyl bằng nhóm chức flo, clo hoặc brom hoặc bằng cách đặt một phân tử thế trên 2'-O. Các phân tử thế thích hợp bao gồm phân tử thế được đưa ra bởi Kmiec II. Các phân tử thế thay thế khác bao gồm phân tử thế được đưa ra nhờ patent Mỹ số 5,334,711 (Sproat) và phân tử thế được đưa ra nhờ các công bố đơn yêu cầu cấp patent EP 629 387 và EP 679 657 (được gọi chung là, đơn của Martin), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Như được sử dụng trong bản mô tả này, dẫn xuất 2'-flo, clo hoặc brom của ribonucleotit hoặc ribonucleotit có 2'-OH được thế bằng phân tử thế được mô tả trong đơn của Martin hoặc Sproat được gọi là "ribonucleotit được thế ở vị trí 2'". Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nucleotit loại ARN" có nghĩa là 2'-hydroxyl hoặc nucleotit được thế ở vị trí 2' được liên kết với các nucleotit khác của oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp bằng liên kết phosphodiester không được thế hoặc liên kết bất kỳ trong số các liên kết phi tự nhiên được đưa ra bởi Kmiec I hoặc Kmiec II. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "nucleotit loại deoxyribo" có nghĩa là nucleotit có 2'-H, có thể được liên kết với các nucleotit khác của MDON bằng liên kết phosphodiester không được thế hoặc liên kết bất kỳ trong số các liên kết phi tự nhiên được đưa ra bởi Kmiec I hoặc Kmiec II.

Theo một phương án của sáng chế, oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp là oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp được liên kết chỉ bằng các liên kết phosphodiester không được thế. Theo các phương án thay thế khác, liên kết này là các phosphodiester được thế, các dẫn xuất phosphodiester và các liên kết dựa trên chất phi phospho như được đưa ra bởi Kmiec II. Theo một phương án khác nữa, mỗi nucleotit loại ARN trong oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp là nucleotit được thế ở vị trí 2'. Các phương án được ưu tiên cụ thể của các ribonucleotit được thế ở vị trí 2' là ribonucleotit được thế bằng 2'-flo, 2'-metoxy, 2'-propyloxy, 2'-allyloxy, 2'-hydroxyetyloxy, 2'-metoxyetyloxy, 2'-flopropyloxy và ribonucleotit được thế bằng 2'-triflopropyloxy. Các phương án được ưu tiên hơn của các ribonucleotit được thế ở vị trí 2' là nucleotit được thế bằng 2'-flo, 2'-metoxy, 2'-metoxyetyloxy, và nucleotit được thế bằng 2'-allyloxy. Theo một phương án khác,

oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp được liên kết bằng các liên kết phosphodiester không được thể.

Mặc dù oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp chỉ có một loại nucleotit loại ARN được thể ở vị trí 2' được tổng hợp một cách thuận tiện hơn, song các phương pháp theo sáng chế có thể được thực hiện bằng các oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp có từ hai hoặc nhiều loại nucleotit loại ARN. Chức năng của đoạn ARN có thể không bị ảnh hưởng bởi điểm gián đoạn do việc đưa deoxynucleotit vào giữa hai trinucleotit loại ARN gây ra, do vậy, thuật ngữ đoạn ARN bao hàm “đoạn ARN bị gián đoạn” này. Đoạn ARN không bị gián đoạn được gọi là đoạn ARN liền kề. Theo một phương án thay thế khác, đoạn ARN có thể chứa nucleotit 2'-OH không được thể và nucleotit kháng RNaza xen kẽ. Tốt hơn, nếu các oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp có ít hơn 100 nucleotit và thậm chí tốt hơn là ít hơn 85 nucleotit, nhưng nhiều hơn 50 nucleotit. Sợi thứ nhất và sợi thứ hai được ghép cặp bazơ theo Watson-Crick. Theo một phương án, các sợi của oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp được liên kết cộng hóa trị bằng một liên kết, như hexanucleotit, pentanucleotit hoặc tetranucleotit sợi đơn sao cho sợi thứ nhất và sợi thứ hai là các đoạn của một chuỗi oligonucleotit đơn lẻ có một đầu tận cùng 3' đơn lẻ và một đầu tận cùng 5' đơn lẻ. Đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5' có thể được bảo vệ bằng cách bổ sung “mũ kẹp tóc” nhờ đó các nucleotit đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5' được ghép cặp theo Watson-Crick với các nucleotit liền kề. Hơn thế nữa, có thể đặt mũ kẹp tóc thứ hai ở điểm nối giữa sợi thứ nhất và sợi thứ hai xa cách với đầu tận cùng 3' và đầu tận cùng 5', sao cho làm ổn định được sự ghép cặp Watson-Crick giữa sợi thứ nhất và sợi thứ hai.

Sợi thứ nhất và sợi thứ hai chứa hai vùng tương đồng với hai đoạn của gen ACCaza đích, tức là có cùng một trình tự với gen đích. Vùng tương đồng chứa các nucleotit của đoạn ARN và có thể chứa một hoặc nhiều nucleotit loại ADN của đoạn ADN kết nối và cũng có thể chứa các nucleotit loại ADN mà không nằm trong đoạn ADN xen giữa. Hai vùng có tính tương đồng được phân cách bởi, và mỗi vùng liền kề với, vùng có trình tự khác biệt với trình tự của gen đích, được gọi là “vùng khác nguồn gốc”. Vùng khác nguồn gốc có thể chứa một, hai hoặc ba nucleotit không hợp đôi. Các nucleotit không hợp đôi có thể liền kề hoặc theo cách khác, có thể được phân cách bởi một hoặc hai nucleotit tương đồng với gen đích. Theo cách khác, vùng khác nguồn gốc cũng có thể chứa một đoạn chèn hoặc một, hai, ba hoặc năm nucleotit trở xuống. Theo cách khác, trình tự của

oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp có thể khác biệt với trình tự của gen đích chỉ bởi sự xóa bỏ một, hai, ba, hoặc năm nucleotit trở xuống ra khỏi oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp này. Trong trường hợp này, chiều dài và vị trí của vùng khác nguồn gốc được cho là chiều dài của đoạn xóa bỏ, ngay cả khi không có nucleotit của oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp này nằm trong vùng khác nguồn gốc. Khoảng cách giữa các đoạn của gen đích bổ trợ cho hai vùng tương đồng là đồng nhất với chiều dài của vùng khác nguồn gốc khi dự định tạo ra đoạn thay thế hoặc các đoạn thay thế. Khi vùng khác nguồn gốc chứa một đoạn chèn, nhờ đó, các vùng tương đồng được phân cách ra xa hơn trong oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp so với các đoạn tương đồng bổ trợ của chúng trong gen này, và sự nghịch đảo là có thể áp dụng được khi vùng khác nguồn gốc mã hóa đoạn xóa bỏ.

Các đoạn ARN của các oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp là mỗi một phần của vùng tương đồng, tức là vùng đồng nhất về trình tự với đoạn của gen đích, tốt hơn, nếu các đoạn này cùng chứa ít nhất 13 nucleotit loại ARN và tốt hơn là chứa 16 nucleotit loại ARN đến 25 nucleotit loại ARN hoặc thậm chí tốt hơn là chứa 18 nucleotit loại ARN đến 22 nucleotit loại ARN hoặc tốt nhất là chứa 20 nucleotit. Theo một phương án, các đoạn ARN của các vùng có tính tương đồng được phân cách bởi và liền kề với, tức là “được kết nối bằng” đoạn ADN xen giữa. Theo một phương án, mỗi nucleotit của vùng khác nguồn gốc là nucleotit của đoạn ADN xen giữa. Đoạn ADN xen giữa chứa vùng khác nguồn gốc của oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp được gọi là “đoạn gây đột biến”.

Dạng thay đổi để đưa vào gen đích được mã hóa bởi vùng khác nguồn gốc. Dạng thay đổi để đưa vào gen này có thể là dạng thay đổi về một hoặc nhiều bazơ của trình tự gen thay đổi axit amin nguyên thể ở vị trí đó thành axit amin mong muốn.

Theo phương án khác của sáng chế, oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp là vật truyền đột biến oligodeoxynucleotit sợi đơn hay SSOMV, được bộc lộ trong đơn quốc tế số PCT/US00/23457; đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Trình tự của SSOMV dựa trên cùng một số nguyên lý với vật truyền đột biến được mô tả trong các patent Mỹ số 5,756,325; 5,871,984; 5,760,012; 5,888,983; 5,795,972; 5,780,296; 5,945,339; 6,004,804; và 6,010,907 và trong các công bố đơn quốc tế số WO 98/49350; WO 99/07865; WO 99/58723; WO 99/58702; WO 99/40789; US 6,870,075; và công bố đơn

yêu cầu cấp patent Mỹ số 20030084473. Trình tự của SSOMV chứa hai vùng tương đồng với trình tự đích được phân cách bởi vùng chứa dạng thay đổi gen mong muốn được gọi là vùng gây đột biến. Vùng gây đột biến có thể có trình tự có cùng chiều dài với trình tự phân cách các vùng tương đồng trong trình tự đích, nhưng có một trình tự khác. Vùng gây đột biến này sẽ gây ra sự thay thế.

Các nucleotit của SSOMV là các deoxyribonucleotit được liên kết bằng các liên kết phosphodiester không được cải biến chỉ có điều liên kết liên nucleotit đầu tận cùng 3' và/hoặc đầu tận cùng 5' hoặc theo cách khác, hai liên kết liên nucleotit đầu tận cùng 3' và/hoặc đầu tận cùng 5' có thể là phosphorothioat hoặc phosphoamidat. Như được sử dụng trong bản mô tả này, liên kết liên nucleotit là sự liên kết giữa các nucleotit của SSOMV và không bao gồm sự liên kết giữa nucleotit đầu tận cùng 3' hoặc nucleotit đầu tận cùng 5' và phần tử thể phong bế, xem, nêu trên. Theo một phương án cụ thể, chiều dài của SSOMV là 21 deoxynucleotit đến 55 deoxynucleotit và do vậy, chiều dài của các vùng có tính tương đồng là tổng chiều dài của ít nhất 20 deoxynucleotit và ít nhất hai vùng có tính tương đồng thì mỗi vùng sẽ có chiều dài ít nhất là 8 deoxynucleotit.

SSOMV có thể được thiết kế để hỗ trợ cho sợi mã hóa hoặc sợi không mã hóa của gen đích. Khi đột biến mong muốn là dạng thay thế một bazơ đơn lẻ, tốt hơn là cả hai nucleotit gây đột biến đều là pyrimidin. Đến mức độ nhất quán với mục đích thu được kết quả chức năng mong muốn, tốt hơn là cả nucleotit gây đột biến và nucleotit được hướng đích trong sợi hỗ trợ đều là pyrimidin. Được đặc biệt ưu tiên là SSOMV ghi mã các đột biến di hoán, tức là nucleotit gây đột biến C hoặc T lần lượt hợp đôi với nucleotit C hoặc T trong sợi hỗ trợ.

Ngoài oligodeoxynucleotit, SSOMV có thể chứa phần tử thể phong bế 5' được gắn vào cacbon đầu tận cùng 5' thông qua một liên kết nào đó. Tính chất hóa học của liên kết này là không quan trọng mà quan trọng là chiều dài của nó, tốt hơn, nếu nó dài ít nhất 6 nguyên tử và liên kết này cần phải mềm dẻo. Có thể sử dụng nhiều phần tử thể không độc như biotin, cholesterol hoặc các steroid khác hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang cation không xen vào. Được đặc biệt ưu tiên là chất phản ứng để tạo ra SSOMV là các chất phản ứng được bán với tên gọi Cy3TM và Cy5TM bởi Glen Research, Sterling VA (nay là GE Healthcare), đây là phosphoroamidit được phong bế mà sau khi sát nhập vào

oligonucleotit lần lượt thu được thuốc nhuộm indomonocacboxyanin được thế 3,3,3',3'-tetrametyl N,N'-isopropyl và thuốc nhuộm indodicacboxyanin được thế 3,3,3',3'-tetrametyl N,N'-isopropyl. Cy3 là chất được ưu tiên nhất. Khi indocacboxyanin được thế N-oxyalkyl, thì nó có thể được liên kết một cách thuận tiện với đầu tận cùng 5' của oligodeoxynucleotit ở dạng phosphodiester có phosphat đầu tận cùng 5'. Tính chất hóa học của dạng liên kết thuốc nhuộm giữa thuốc nhuộm và oligodeoxynucleotit là không quan trọng và được chọn vì sự thuận tiện cho quá trình tổng hợp. Khi phosphoramidit Cy3 có bán trên thị trường được sử dụng như được chỉ dẫn, thì dạng cải biến 5' thu được bao gồm phần tử thế phong bế và liên kết đi kèm là N-hydroxypropyl, N'-phosphatidylpropyl 3,3,3',3'-tetrametyl indomonocacboxyanin.

Theo một phương án được ưu tiên, thuốc nhuộm indocacboxyanin được thế bốn lần ở vị trí 3 và vị trí 3' của vòng indol. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, các dạng thay thế này ngăn không cho thuốc nhuộm này trở thành thuốc nhuộm xen vào. Mức độ đồng nhất của phần tử thế ở các vị trí này là không quan trọng. Hơn thế nữa, SSOMV còn có thể có phần tử thế phong bế 3'. Hơn nữa, tính chất hóa học của phần tử thế phong bế 3' này là không quan trọng.

Theo một phương án được ưu tiên khác, oligonucleotit tạo ra sự tái tổ hợp là oligodeoxynucleotit sợi đơn có nucleotit đầu tận cùng 3', nucleotit đầu tận cùng 5', có ít nhất 25 deoxynucleotit và không nhiều hơn 65 deoxynucleotit, và có trình tự chứa ít nhất hai vùng, mỗi vùng có ít nhất 8 deoxynucleotit mà mỗi vùng lần lượt đồng nhất với ít nhất hai vùng của gen nhiễm sắc thể được hướng đích, các vùng này chung lại có chiều dài ít nhất 24 nucleotit, và các vùng này được phân cách bởi ít nhất một nucleotit trong trình tự của gen nhiễm sắc thể được hướng đích hoặc trong trình tự của oligodeoxynucleotit hoặc cả hai sao cho trình tự của oligodeoxynucleotit là không đồng nhất với trình tự của gen nhiễm sắc thể được hướng đích. Xem patent Mỹ 6,271,360, tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Phương tiện mang siêu nhỏ và sợi siêu nhỏ

Cách sử dụng phương tiện mang siêu nhỏ bằng kim loại (vi cầu) để đưa các đoạn ADN lớn vào các tế bào thực vật có thành tế bào của xenluloza theo phương pháp chọc thủng bằng vật thể phóng đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ (sau

đây gọi là phân phối bằng bắn phá sinh học). Các patent Mỹ số 4,945,050; 5,100,792 và 5,204,253 mô tả các kỹ thuật chung dùng để lựa chọn phương tiện mang siêu nhỏ và các thiết bị dùng để phóng chúng. Các patent Mỹ số 5,484,956 và 5,489,520 mô tả việc điều chế ngô chuyển gen có khả năng sinh sản bằng cách áp dụng phương pháp bắn phá bằng vật thể phóng siêu nhỏ mô sẹo ngô. Các kỹ thuật bắn phá sinh học cũng được sử dụng để biến nạp phôi ngô chưa trưởng thành.

Các điều kiện cụ thể để sử dụng phương tiện mang siêu nhỏ trong các phương pháp theo sáng chế được mô tả trong công bố đơn quốc tế số WO 99/07865. Theo một kỹ thuật minh họa, phương tiện mang siêu nhỏ được làm lạnh bằng nước đá (60mg/ml), oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp (60mg/ml) 2,5M CaCl_2 và 0,1M spermidine được bổ sung theo trật tự đó; hỗn hợp này được khuấy nhẹ, ví dụ, bằng cách trộn xoáy, trong 10 phút và được để ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, tiếp đó, phương tiện mang siêu nhỏ được pha loãng trong 5 phần thể tích của etanol, được ly tâm và được tạo huyền phù lại trong 100% etanol. Có thể thu được kết quả tốt với nồng độ trong dung dịch kết dính chứa 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ đến 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ phương tiện mang siêu nhỏ, 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đến 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp, 1,1M đến 1,4M CaCl_2 và 18mM đến 22mM spermidine. Đã quan sát thấy các kết quả tối ưu trong các điều kiện dung dịch kết dính chứa 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ phương tiện mang siêu nhỏ, 16,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp, 1,3M CaCl_2 và 21mM spermidine.

Cũng có thể đưa oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp vào các tế bào thực vật dùng để thực hiện sáng chế bằng cách sử dụng sợi siêu nhỏ để chọc thủng thành tế bào và màng tế bào. Patent Mỹ số 5,302,523 cấp cho Coffee và các đồng tác giả mô tả cách sử dụng sợi silic cacbua 30 lần 0,5 μm và sợi silic cacbua 10 lần 0,3 μm để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biến nạp sản phẩm nuôi cấy ngô dạng huyền phù của Black Mexican Sweet. Kỹ thuật cơ học bất kỳ có thể được sử dụng để đưa ADN vào cho quá trình biến nạp tế bào thực vật bằng cách sử dụng sợi siêu nhỏ có thể được sử dụng để phân phối oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp để sử dụng nhằm tạo ra các thể đột biến ACCaza này. Một kỹ thuật minh họa về phương pháp phân phối oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp bằng sợi siêu nhỏ là như sau: sợi siêu nhỏ vô trùng (2 μg) được tạo huyền phù trong 150 μl của môi trường nuôi cấy thực vật chứa khoảng 10 μg oligonucleotit sợi xoắn kép hỗn hợp. Để sản phẩm nuôi cấy huyền phù lắng xuống và các phần thể tích ngang bằng

của các tế bào đã được đóng gói và huyền phù sợi vô trùng/nucleotit được trộn xoáy trong 10 phút và được dàn mỏng. Môi trường chọn lọc được áp dụng ngay lập tức hoặc với thời gian trì hoãn lên đến 120 giờ nếu thấy thích hợp để có được tính trạng cụ thể.

Biến nạp bằng xung điện

Theo một phương án thay thế khác, oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp có thể được phân phối đến tế bào thực vật bằng cách biến nạp bằng xung điện đối với thể nguyên sinh được tạo ra từ một bộ phận của thực vật theo các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ. Ví dụ, xem các tài liệu: Gallois *et al.*, 1996, trong *Methods Molecular Biology* 55:89-107, Humana Press, Totowa, N.J.; Kipp *et al.*, 1999, trong *Methods Molecular Biology* 133:213-221, Humana Press, Totowa, N.J.

Cũng có thể đưa oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp vào vi bào tử bằng cách biến nạp bằng xung điện. Sau khi giải phóng tứ tử, vi bào tử là đơn nhân và có thành mỏng. Nó bắt đầu mở rộng và phát triển lỗ nảy mầm trước khi màng ngoài hình thành. Vi bào tử ở giai đoạn này về tiềm năng thì thích hợp đối với quá trình biến nạp bằng ADN ngoại sinh hơn so với các tế bào thực vật khác. Hơn thế nữa, sự phát triển của vi bào tử có thể được thay đổi *in vitro* để tạo ra phôi đơn bội hoặc mô sẹo phôi hóa có thể được tái tạo thành thực vật (Coumans *et al.*, *Plant Cell Rep.* 7:618-621, 1989; Datta *et al.*, *Plant Sci.* 67:83-88, 1990; Maheshwari *et al.*, *Am. J. Bot.* 69:865-879, 1982; Schaeffer, *Adv. In Cell Culture* 7:161-182, 1989; Swanson *et al.*, *Plant Cell Rep.* 6:94-97, 1987). Vì vậy, có thể tái tạo vi bào tử đã được biến nạp một cách trực tiếp thành thực vật đơn bội hoặc thực vật đơn bội kép có khả năng sinh sản sau khi nhân đôi nhiễm sắc thể theo các phương pháp tiêu chuẩn. Xem thêm đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 09/680,858 có tên sáng chế là chế phẩm và phương pháp cải biến gen thực vật, đơn này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các phương pháp biến nạp bằng xung điện vi bào tử được mô tả trong tài liệu: Jardinaud *et al.*, *Plant Sci.* 93:177-184, 1993, và Fennell and Hauptman, *Plant Cell Reports* 11:567-570, 1992. Các phương pháp biến nạp bằng xung điện đưa MDON vào thể nguyên sinh thực vật cũng có thể được làm thích ứng để sử dụng trong phương pháp biến nạp bằng xung điện vi bào tử.

Sợi mịn và vi tiêm

Theo một phương án thay thế khác, oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp có thể được phân phối đến tế bào thực vật bằng sợi mịn hoặc vi tiêm tế bào thực vật. Phương pháp gọi là kỹ thuật sợi mịn được thực hiện về cơ bản như được mô tả trong tài liệu: Frame *et al.*, 1994, *Plant J.* 6:941-948. Oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp được bổ sung vào sợi mịn và được sử dụng để biến nạp các tế bào thực vật. Oligonucleobazơ tạo ra sự tái tổ hợp có thể được ủ đồng thời với plasmit chứa các trình tự mã hóa các protein có khả năng tạo các phức hợp recombinaza trong tế bào thực vật sao cho quá trình tái tổ hợp được xúc tác giữa oligonucleotit và trình tự đích.

Việc lựa chọn thực vật

Theo các phương án khác nhau, các loài thực vật như được bộc lộ trong bản mô tả này có thể thuộc loài bất kỳ trong số thực vật hai lá mầm, thực vật một lá mầm hoặc thực vật hạt trần, trong đó có các loài thực vật thân gỗ bất kỳ sinh trưởng ở dạng cây lưu niên hoặc cây bụi, loài thân thảo bất kỳ, hoặc loài bất kỳ sản sinh trái ăn được, các hạt giống hoặc loài thực vật, hoặc loài bất kỳ sản sinh hoa có màu sắc sỡ hoặc hoa thơm. Ví dụ, loài thực vật này có thể được chọn từ loài thực vật từ nhóm bao gồm cải dầu, hướng dương, ngô, thuốc lá, củ cải đường, bông, ngô, lúa mì, lúa mạch, lúa gạo, cỏ linh lăng, lúa mạch, lúa miến, cà chua, xoài, đào, táo, lê, dâu tây, chuối, dưa tây, khoai tây, cà rốt, rau diếp, hành, đậu nành, mía, đậu Hà Lan, đậu gà, đậu Hà Lan nâu, đậu răng ngựa, đậu lăng, củ cải, củ cải Thụy Điển, cải Brussel, đậu cánh chim, súp lơ, cải xoăn, đậu răng ngựa, dương, thông, bạch đàn, nho, cây thuộc họ cam chanh, tiểu hắc mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, yến mạch, cỏ lớp đất mặt và cỏ làm thức ăn gia súc, lanh, cải dầu, cải cay, dưa chuột, bìm bịp, cây bóng nước, hồ tiêu, cà tím, cúc vạn thọ, sen, cải bắp, cúc, cẩm chướng, tulip, diên vĩ, huệ, và các loài thực vật sản sinh hạt bởi vì chúng đã không được đề cập một cách cụ thể.

Các loài thực vật và các tế bào thực vật có thể được kiểm tra về sức đề kháng hoặc sức chống chịu đối với chất diệt cỏ bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết nhiều trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách nuôi cấy thực vật hoặc tế bào thực vật khi có mặt chất diệt cỏ và đo tốc độ sinh trưởng so với tốc độ sinh trưởng khi không có mặt chất diệt cỏ.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, mức độ sinh trưởng gần như bình thường của thực vật, cơ quan thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật được định nghĩa là tốc độ sinh trưởng hoặc tốc độ phân chia tế bào thực vật, cơ quan thực vật, mô thực vật, hoặc tế bào thực vật này ít nhất là 35%, ít nhất là 50%, ít nhất là 60%, hoặc ít nhất là 75% tốc độ sinh trưởng hoặc tốc độ phân chia tế bào ở thực vật, cơ quan thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật tương ứng biểu hiện protein AHAS loại hoang.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự phát triển gần như bình thường của thực vật, cơ quan thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật được định nghĩa là sự xảy ra một hoặc nhiều sự phát triển ở thực vật, cơ quan thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật này là gần như tương tự với những hiện tượng xảy ra ở thực vật, cơ quan thực vật, mô thực vật hoặc tế bào thực vật tương ứng biểu hiện protein loại hoang.

Theo các phương án nhất định, các cơ quan thực vật được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lá, thân, rễ, chồi, nụ hoa, mô phân sinh, phôi, lá mầm, nội nhũ, đài hoa, cánh hoa, nhụy hoa, lá noãn, nhị hoa, bao phấn, vi bào tử, phấn hoa, ống phấn, noãn, bầu nhụy và trái, hoặc các phần cắt, lát hoặc khoanh được lấy từ đó. Mô thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mô sẹo, mô cơ bản, mô mạch, mô dự trữ, mô phân sinh, mô lá, mô chồi, mô rễ, mô vú lá, mô khối u thực vật, và mô sinh sản. Các tế bào thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tế bào phân lập được có thành tế bào, các dạng kết tụ có kích thước khác nhau của chúng, và thể nguyên sinh.

Các loài thực vật là “chống chịu” đáng kể đối với chất diệt cỏ liên quan nếu cho chúng tiếp xúc với chất diệt cỏ và tạo ra đường cong liều lượng/đáp ứng chuyển dịch sang bên phải khi so với đường cong liều lượng/đáp ứng do loài thực vật tương tự không chống chịu được cho tiếp xúc theo cách tương tự tạo ra. Các đường cong liều lượng/đáp ứng này có “liều lượng” được vẽ đồ thị trên trục X và “tỷ lệ phần trăm tiêu diệt”, “tác dụng diệt cỏ”, v.v., được vẽ đồ thị trên trục y. Các loài thực vật chống chịu sẽ cần đến nhiều chất diệt cỏ hơn so với các loài thực vật tương tự không chống chịu để tạo ra một tác dụng diệt cỏ nhất định. Các loài thực vật “đề kháng” đáng kể đối với thuốc diệt cỏ thể hiện ít, nếu có, tổn thương hoại tử, tổn thương phân giải, tổn thương úa vàng hoặc các tổn thương khác, khi được cho tiếp xúc với chất diệt cỏ ở các nồng độ và tỷ lệ thường

được sử dụng bởi cộng đồng hóa nông để tiêu diệt cỏ trên đồng ruộng. Các loài thực vật đề kháng với một chất diệt cỏ nào đó thì cũng chống chịu với chất diệt cỏ đó.

Tạo thực vật

Đã biết việc nuôi cấy mô của các mô khác nhau của các loài thực vật và việc tái tạo các loài thực vật từ đó. Ví dụ, việc nhân giống cây cải dầu theo phương pháp nuôi cấy mô được mô tả trong, nhưng không chỉ giới hạn ở, tài liệu bất kỳ trong số các tài liệu sau: Chuong *et al.*, “A Simple Culture Method for *Brassica Hypocotyls Protoplasts*”, *Plant Cell Reports* 4:4-6, 1985; Barsby, T. L., *et al.*, “A Rapid and Efficient Alternative Procedure for the Regeneration of Plants from *Hypocotyls Protoplasts of Brassica napus*”, *Plant Cell Reports* (Spring, 1996); Kartha, K., *et al.*, “In vitro Plant Formation from Stem Explants of Rape”, *Physiol. Plant*, 31:217-220, 1974; Narasimhulu, S., *et al.*, “Species Specific Shoot Regeneration Response of Cotyledonary Explants of Brassicas”, *Plant Cell Reports* (Spring 1988); Swanson, E., “Microspore Culture in *Brassica*”, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6, Chapter 17, p. 159, 1990.

Quá trình tái sinh thêm giống có thể xảy ra theo phương pháp nuôi cấy mô và tái tạo. Việc nuôi cấy mô của các mô khác nhau của đậu nành và tái tạo các cá thể thực vật từ đó là đã biết rõ và được công bố rộng rãi. Ví dụ, có thể tham khảo tài liệu: Komatsuda, T. *et al.*, “Genotype X Sucrose Interactions for Somatic Embryogenesis in Soybeans”, *Crop Sci.* 31:333-337, 1991; Stephens, P. A., *et al.*, “Agronomic Evaluation of Tissue-Culture-Derived Soybean Plants”, *Theor. Appl. Genet.* 82:633-635, 1991; Komatsuda, T. *et al.*, “Maturation and Germination of Somatic Embryos as Affected by Sucrose and Plant Growth Regulators in Soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28:103-113, 1992; Dhir, S. *et al.*, “Regeneration of Fertile Plants from Protoplasts of Soybean (*Glycine max* L. Merr.); Genotypic Differences in Culture Response”, *Plant Cell Reports* 11:285-289, 1992; Pandey, P. *et al.*, “Plant Regeneration from Leaf and Hypocotyl Explants of *Glycine wightii* (W. and A.) VERDC. Var. Longicauda”, *Japan J. Breed.* 42:1-5, 1992; và Shetty, K., *et al.*, “Stimulation of In vitro Shoot Organogenesis in *Glycine max* (Merrill.) by Allantoin and Amides”, *Plant Science* 81:245-251, 1992. Nội dung bộc lộ của patent Mỹ số 5,024,944 cấp ngày 18 tháng 6 năm 1991 cho Collins và các đồng tác giả, và patent Mỹ số

5,008,200 cấp ngày 16 tháng 4 năm 1991 cho Ranch và các đồng tác giả, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các ví dụ dưới đây minh họa việc thực hiện sáng chế nhưng không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

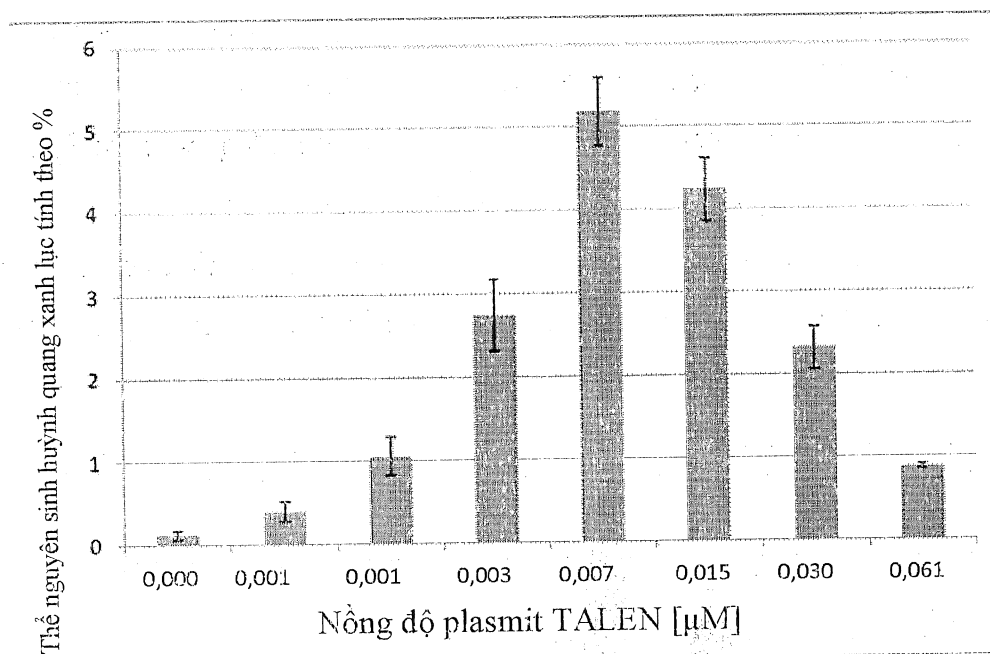
Ví dụ 1: Mức độ chuyển hóa được cải thiện nhiều của gen protein huỳnh quang xanh lam (blue fluorescent protein - BFP) trong các tế bào *Arabidopsis thaliana* chuyển gen thành protein phát huỳnh quang xanh lục (green fluorescing protein - GFP) bằng cách đưa dạng đột biến nucleotit đơn được hướng đích thông qua oligonucleotit sửa chữa gen (GRON) kết hợp với cặp nucleaza hiệu ứng giống chất hoạt hóa quá trình phiên mã (TALEN) phân cắt gần chỗ thay đổi bazơ được hướng đích.

Dòng *Arabidopsis* có nhiều bản sao của gen protein huỳnh quang xanh lam được tạo ra theo các phương pháp mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết (ví dụ, xem tài liệu: Clough and Brent, 1998). Các sản phẩm nuôi cấy mô phân sinh được tạo ra từ rễ được thiết lập với dòng này, được sử dụng để phân lập thể nguyên sinh và nuôi cấy (ví dụ, xem tài liệu: Mathur *et al.*, 1995). Mục đích phân phối GRON vào thể nguyên sinh đạt được thông qua quá trình hấp thụ GRON nhờ polyetylen glycol (PEG) vào thể nguyên sinh. Phương pháp sử dụng đĩa có 96 lỗ, tương tự phương pháp được mô tả bởi Fujiwara và Kato (2007) đã được áp dụng. Trong phần dưới đây, quy trình này được mô tả một cách ngắn gọn. Thể tích được đưa ra là thể tích được áp dụng cho các lỗ riêng biệt của đĩa có 96 lỗ.

1. Trộn 6,25µl hỗn hợp GRON/TALEN (80µM GRON BFP4 Coding/41mer) với 25µl thể nguyên sinh được tạo ra từ mô phân sinh rễ *Arabidopsis* BFP chuyển gen ở mức 5×10^6 tế bào/ml trong mỗi lỗ của đĩa có 96 lỗ.
2. 31,25µl dung dịch PEG 40% được bổ sung và thể nguyên sinh được trộn.
3. Các tế bào đã được xử lý được ủ trên nước đá trong 30 phút.
4. 200µl dung dịch W5 được bổ sung vào mỗi lỗ và các tế bào được trộn.
5. Cho phép ủ các đĩa này trên nước đá trong 30 phút cho thể nguyên sinh lắng xuống đáy của mỗi lỗ.
6. 200µl môi trường bên trên thể nguyên sinh đã lắng xuống được loại ra.

7. 85 μ l môi trường nuôi cấy (MSAP, xem tài liệu: Mathur *et al.*, 1995) được bổ sung.
8. Các đĩa này được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong bóng tối trong 48 giờ. Nồng độ cuối của GRON sau khi bổ sung môi trường nuôi cấy là 8 μ M.

Bằng cách áp dụng quy trình này, plasmit TALEN ở các mức nồng độ khác nhau được đưa vào cùng với GRON. Bốn mươi tám giờ sau khi phân phối GRON, các mẫu được phân tích theo phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy để phát hiện thể nguyên sinh mà sự phát huỳnh quang xanh lục và vàng của chúng là khác với sự phát huỳnh quang xanh lục và vàng của thể nguyên sinh đối chứng. Sự phát huỳnh quang xanh lục là do việc đưa đột biến được hướng đích vào gen BFP gây ra, đem lại quá trình tổng hợp GFP. Các kết quả này được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Thể nguyên sinh được tạo ra từ mô phân sinh rễ được xử lý bằng plasmit TALEN ở các nồng độ khác nhau cùng với GRON hướng đích đột biến vào gen BFP, gây ra hiện tượng chuyển hóa thành gen GFP. Mức độ biểu hiện GFP được đo theo phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy 48 giờ sau khi phân phối GRON/TALEN

Đối với tất cả các ví dụ từ 2 đến 11 dưới đây, áp dụng phần ghi chú sau:

Các GRON

Kiểu thiết kế hướng đích BFP->GFP.

BFP->GFP H66Y CAC->TAC.

BFP4/C/41/5'Cy3/3'idC

VCCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

BFP4/NC/41/5'Cy3/3'idC

VGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

Kiểu thiết kế đối chứng không hướng đích BFP.

BFP H66 – CAC

BFP0/C/41/5'3PS/3'3PS

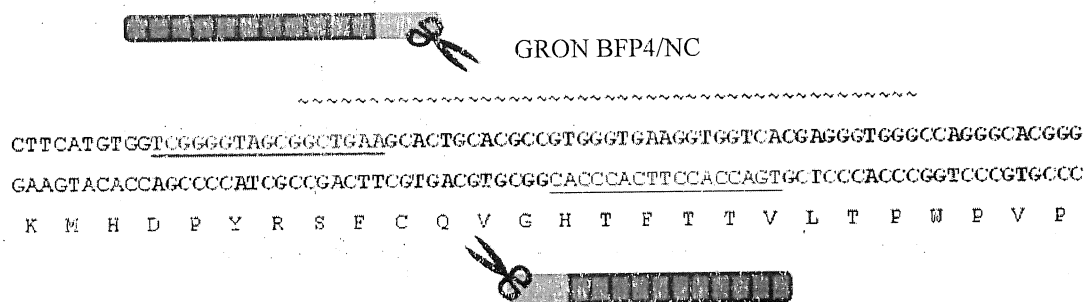
VCCCTCGTGACCACCTTCACCCACGGCGTGCAGTGCTTCAGCH

BFP0/NC/41/5'3PS/3'3PS

VGCTGAAGCACTGCACGCCGTGGGTGAAGGTGGTCACGAGGGH

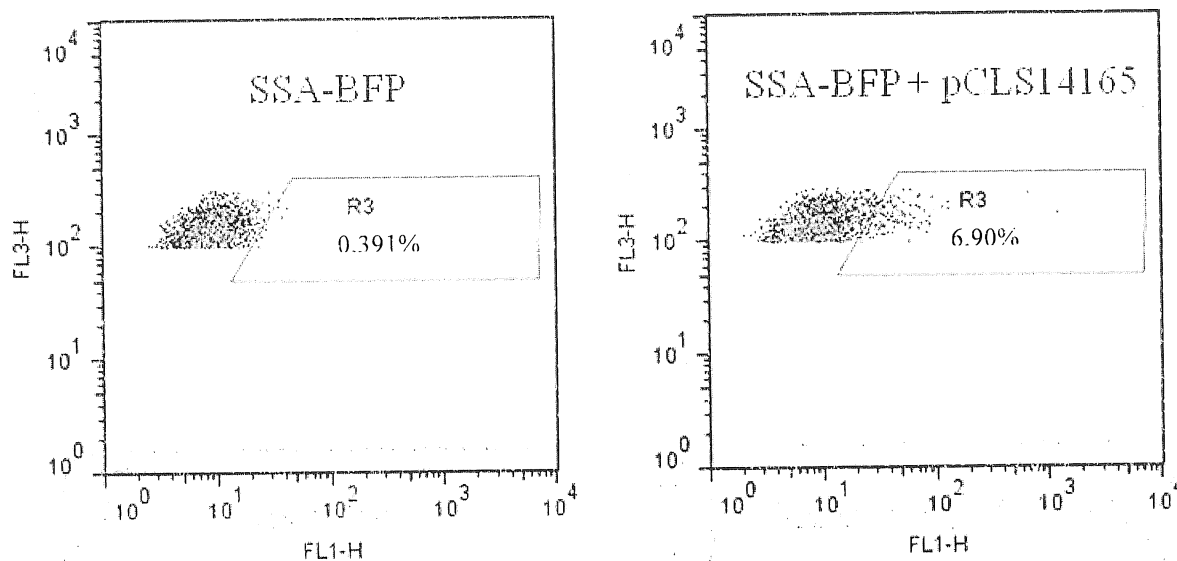
Các TALEN:

Miền liên kết ADN của chất hiệu ứng TAL



Miền liên kết ADN của chất hiệu ứng TAL

pCLS14165 có cả hai nhánh TAL (được thiết kế theo Zhang *et al.*, 2013) trên một plasmid đơn lẻ mà mỗi nhánh liên kết với trình tự được gạch dưới và được liên kết với monome FokI. Sự kết hợp này tạo ra sự đứt sợi đôi (DSB) như được thể hiện dưới đây trong thử nghiệm gắn kết sợi đơn (single strand annealing assay-SSA) được thực hiện theo cùng một cách với các thử nghiệm trong tài liệu của Zhang và các đồng tác giả. (2013)



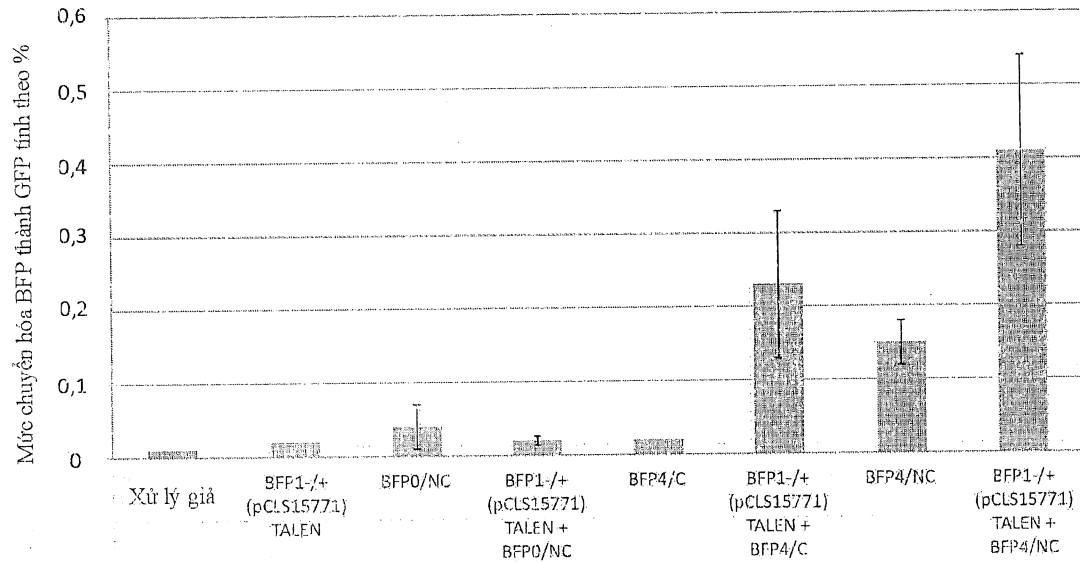
pCLS15771 là nickaza có đột biến (D450A) trong miền FokI đối với nhánh trái. Nhánh phải trong cấu trúc này là theo pCLS14165.

pCLS15769 là nickaza có đột biến (D450A) trong miền FokI đối với nhánh phải. Nhánh trái trong cấu trúc này là theo pCLS14165.

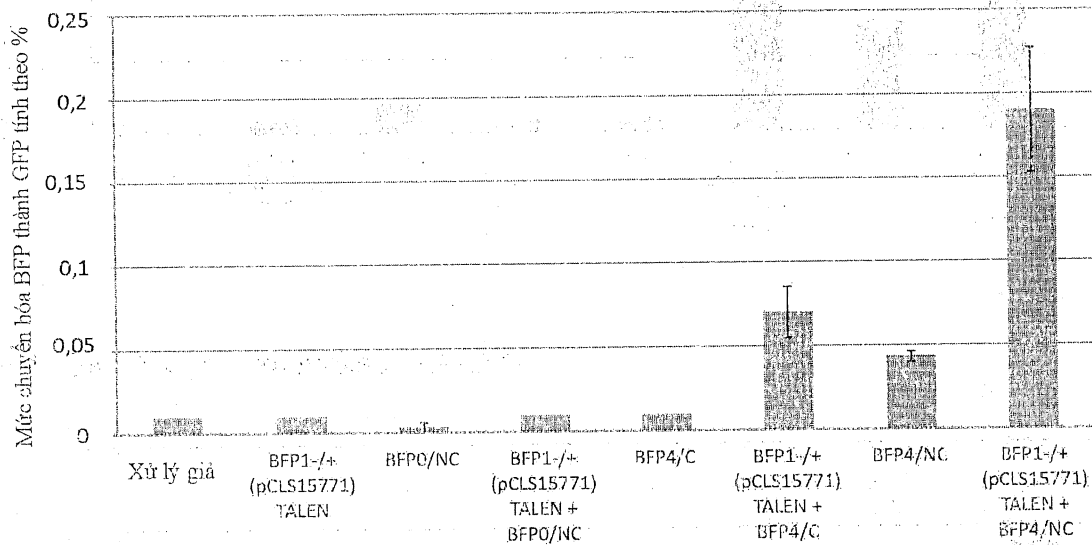
Các GRON và TALEN được kiểm tra như được thể hiện dưới đây. Các phương pháp xử lý đối chứng bao gồm các GRON không hướng đích (BFP0/C hoặc BFP0/NC) và TALEN riêng rẽ cũng như các phương pháp xử lý giả bằng dung dịch PEG 40% thiếu các GRON hoặc plasmid TALEN đã không có hoạt tính chuyển hóa đáng kể nào.

Trong hệ thống này, tốt hơn, nếu kiểu thiết kế GRON BFP4/NC riêng rẽ là kiểu thiết kế GRON BFP4/C riêng rẽ. Việc kết hợp các kiểu thiết kế này với DSB TALEN (pCLS14165) cải thiện cả hai với hoạt tính tốt nhất và mức cải thiện gấp nhiều lần (trong nhiều trường hợp > 2 bậc độ lớn) với GRON BFP4/C. Cũng đã quan sát thấy sự cải thiện đáng kể để kết hợp các GRON với các cặp nickaza TALEN và được kỳ vọng là có lợi nhất bằng cách giảm thiểu thiệt hại ngoài dự định khi các đột biến được hướng đích một cách đồng thời ở một vài gen/ổ gen/alen.

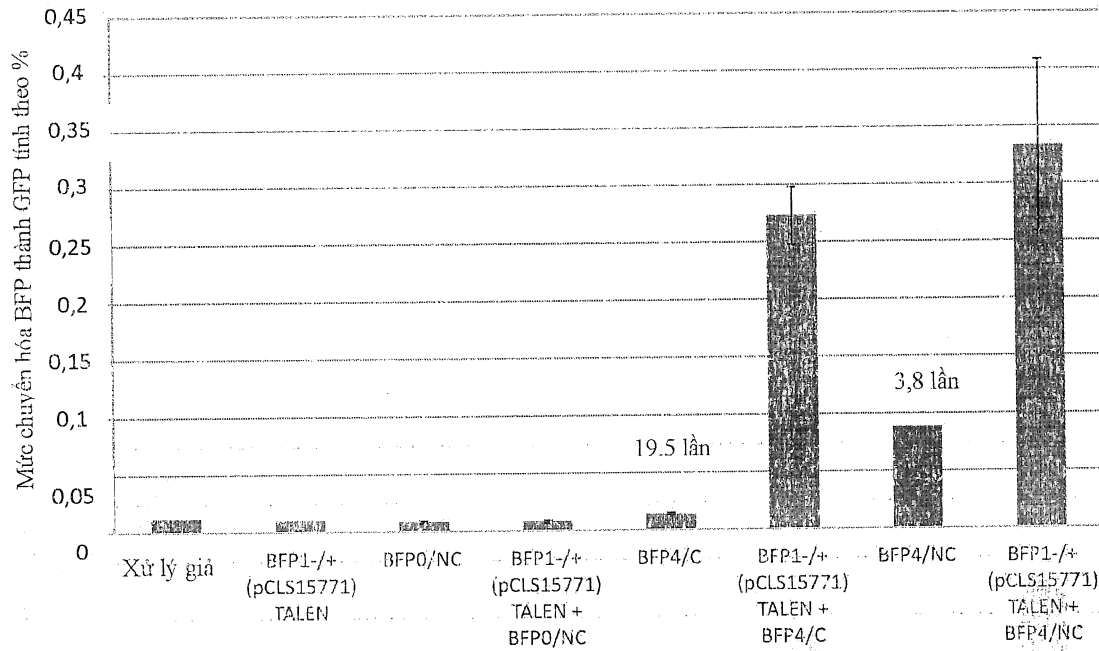
Ví dụ 2: GRON cộng với nickaza TALEN.



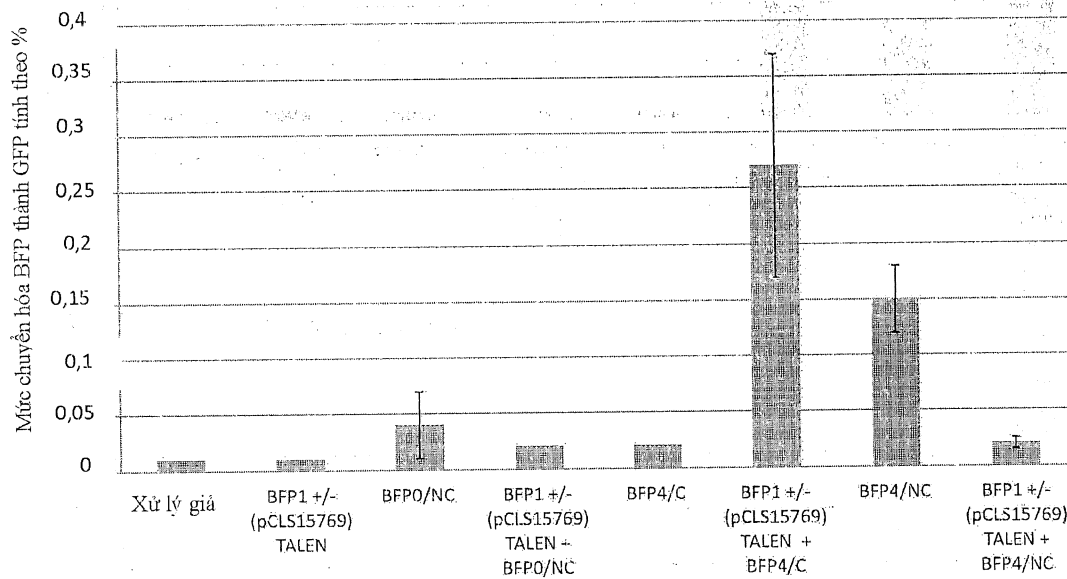
Ví dụ 3: GRON cộng với nickaza TALEN.



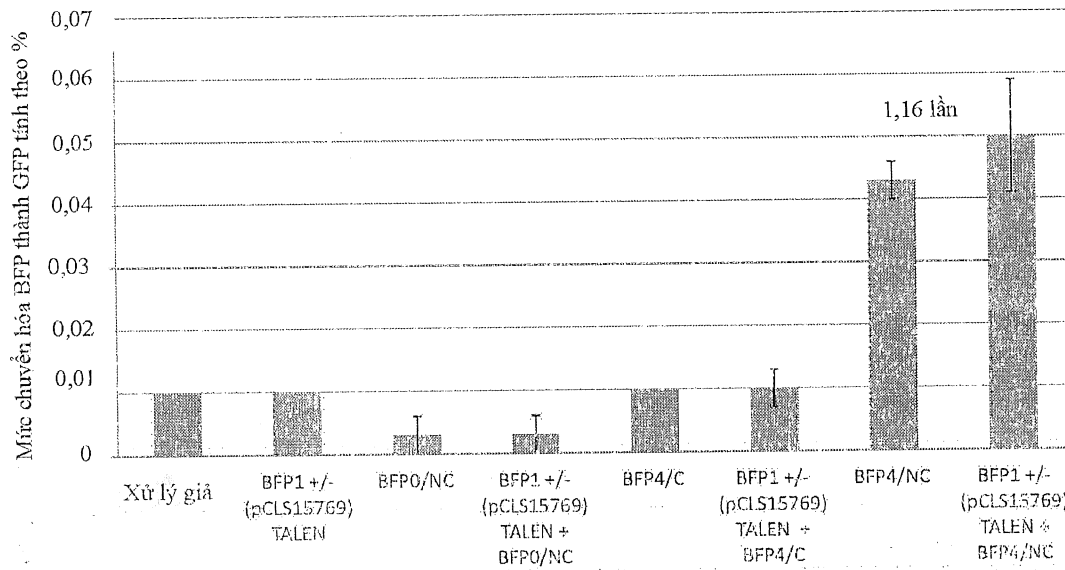
Ví dụ 4: GRON cộng với nickaza TALEN.



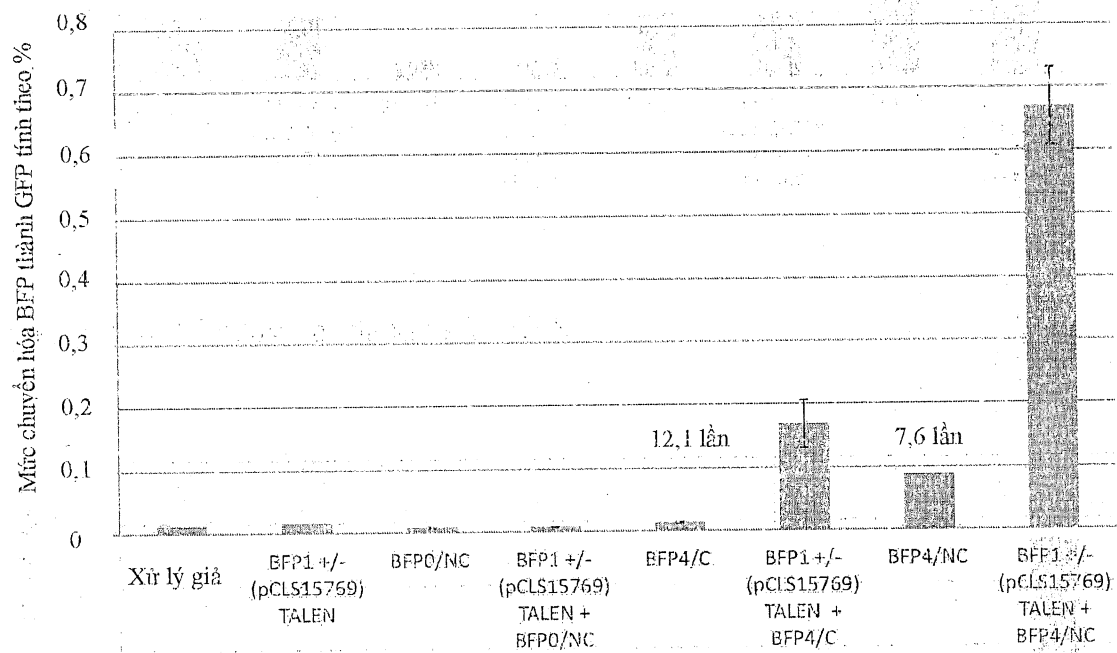
Ví dụ 5: GRON cộng với nickaza TALEN.



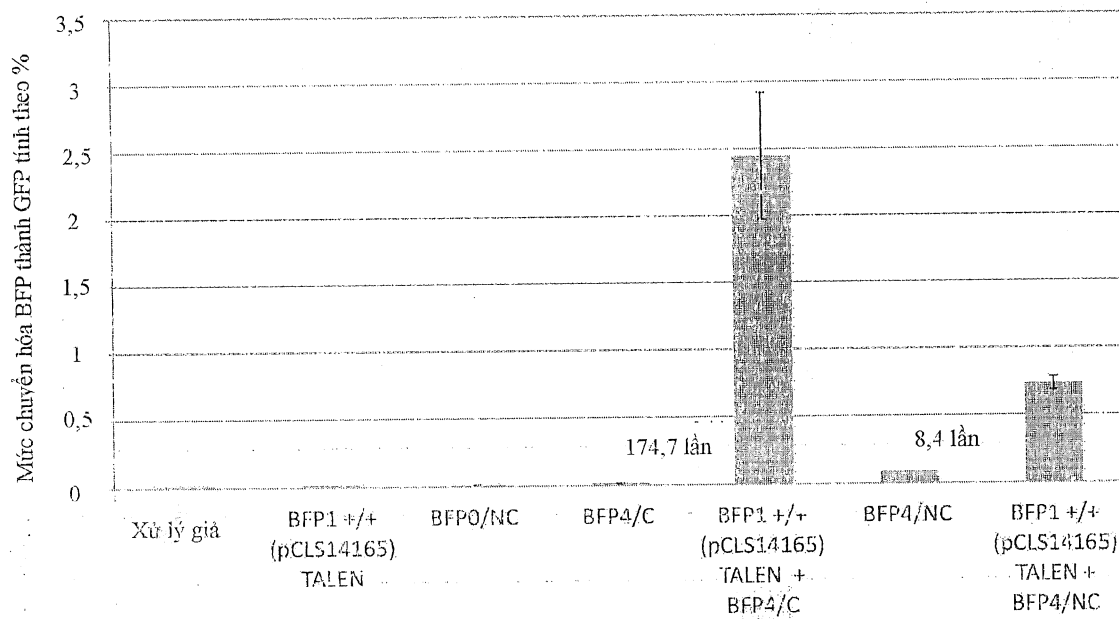
Ví dụ 6: GRON cộng với nickaza TALEN.



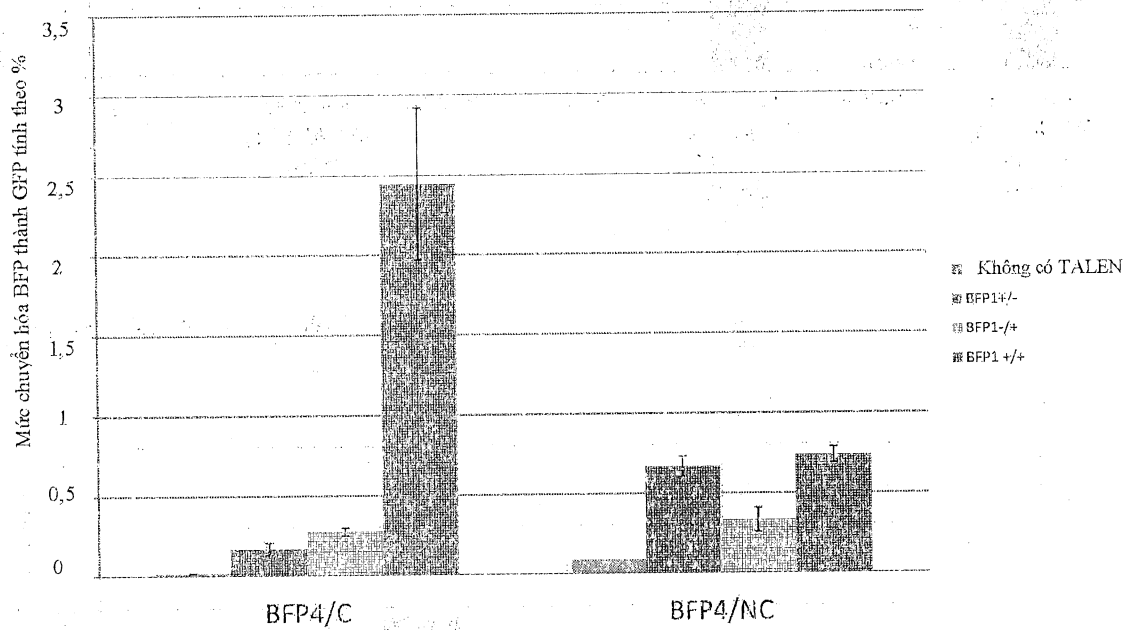
Ví dụ 7: GRON cộng với nickaza TALEN.



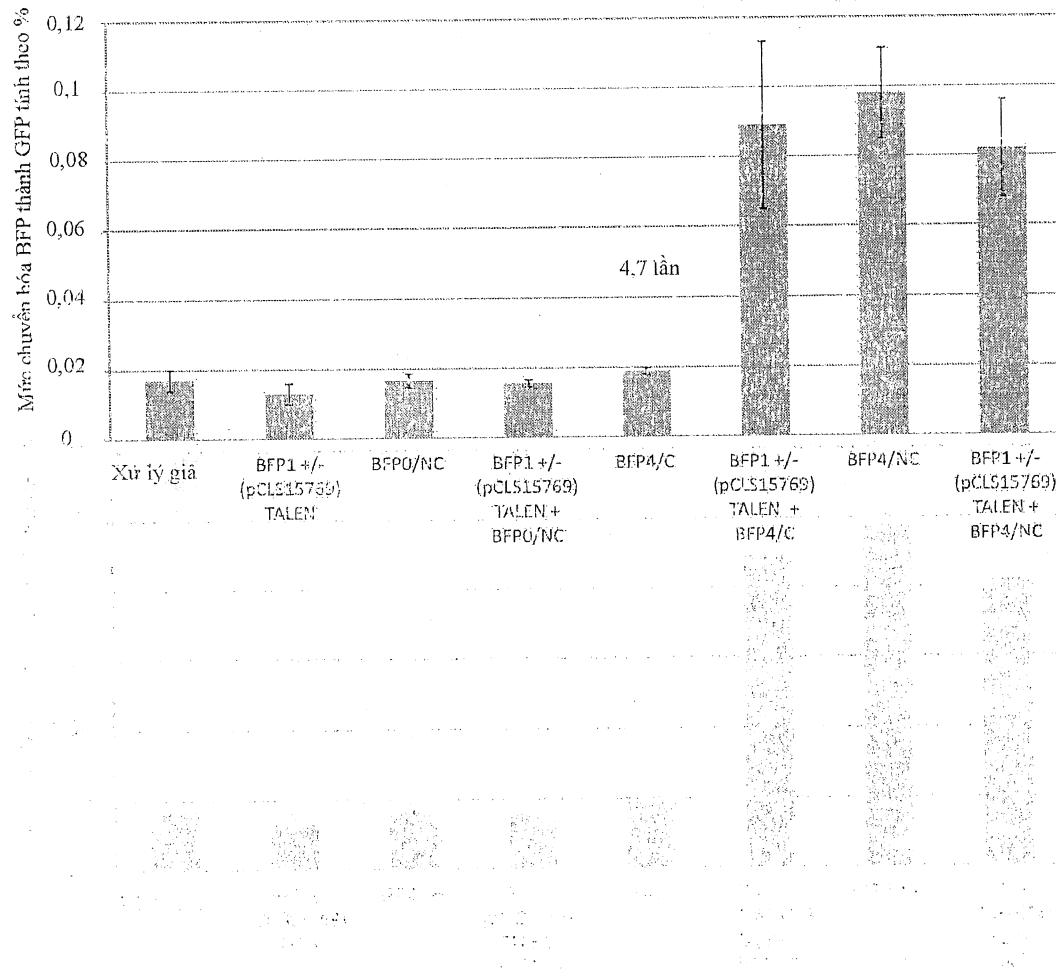
Ví dụ 8: GRON cộng với DSB TALEN.



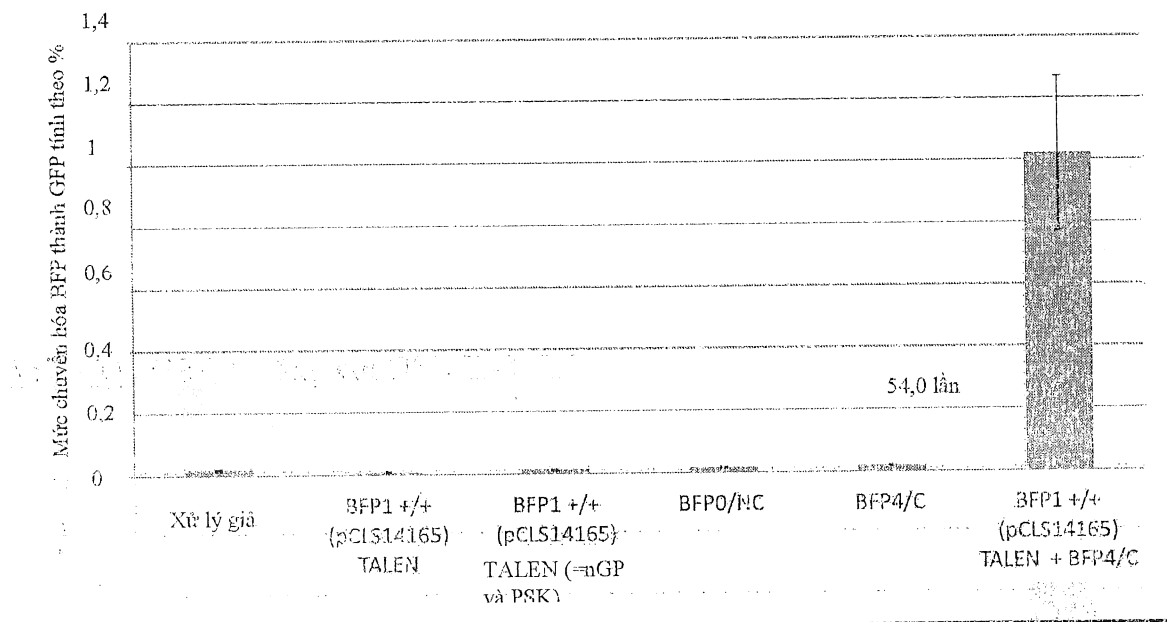
Ví dụ 9: GRON cộng với TALEN.



Ví dụ 10: GRON cộng với nickaza TALEN.



Ví dụ 11: GRON cộng với DSB TALEN.



Tài liệu tham khảo

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.

Mathur, J., Szabados, L., and Koncz, C. (1995) A simple method for isolation, liquid culture, transformation and regeneration of *Arabidopsis thaliana* protoplasts. *Plant Cell Rep.* 14, 221-226

Fujikawa Y, Kato N (2007) Split luciferase complementation assay to study protein-protein interactions in *Arabidopsis* protoplasts. *Plant J* 52: 185–195.

Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. (2013) Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol.* 161(1):20-7.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp đưa đột biến do oligonucleobazo sửa chữa gen (GRON) gây ra vào trình tự axit deoxyribonucleic (ADN) đích trong tế bào thực vật, phương pháp bao gồm các bước:

nuôi cấy tế bào trong các điều kiện làm tăng một hoặc nhiều quá trình sửa chữa ADN của tế bào trước khi và/hoặc đồng thời với việc phân phối GRON vào tế bào thực vật,

trong đó các điều kiện làm tăng một hoặc nhiều quá trình sửa chữa ADN của tế bào bao gồm việc đưa vào một hoặc nhiều nickaza đặc hiệu vị trí vào tế bào thực vật, và trong đó một hoặc nhiều nickaza đặc hiệu vị trí này đưa vào các điểm gián đoạn (nick) sợi đơn ở vùng lân cận của vị trí được nhắm đích để chuyển hóa bởi GRON.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều nickaza được chọn từ TALEN nickaza, nickaza ngón tay kẽm và meganucleaza nickaza.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó một hoặc nhiều nickaza đặc hiệu vị trí được liên hợp cộng hóa trị với GRON.

4. Phương pháp theo một trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó tế bào này là tế bào thực vật thuộc loài được chọn từ nhóm bao gồm cải dầu, hướng dương, ngô, thuốc lá, củ cải đường, bông, ngô, lúa mì, lúa mạch, lúa gạo, cỏ linh lăng, lúa mạch, lúa miến, cà chua, xoài, đào, táo, lê, dâu tây, chuối, dưa tây, khoai tây, cà rốt, rau diếp, hành, đậu nành, mía, đậu Hà Lan, đậu gà, đậu Hà Lan nâu, đậu răng ngựa, đậu lăng, củ cải, củ cải Thụy Điển, cải Brussel, đậu cánh chim, súp lơ, cải xoăn, đậu răng ngựa, dương, thông, bạch đàn, nho, cây thuộc họ cam chanh, tiểu hắc mạch, cỏ linh lăng, lúa mạch đen, yến mạch, cỏ lớp đất mặt và cỏ làm thức ăn gia súc, lanh, cải dầu, cải cay, dưa chuột, bí bịp, cây bóng nước, hồ tiêu, cà tím, cúc vạn thọ, sen, cải bắp, cúc, cẩm chướng, tulip, diên vĩ và huệ.

5. Phương pháp theo một trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó tế bào là tế bào chuyển gen.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó trình tự ADN đích là gen nội sinh của tế bào.

7. Phương pháp theo một trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó phương pháp này còn bao gồm việc tái tạo thực vật có đột biến được đưa vào bằng GRON từ tế bào thực vật.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đánh giá hiệu quả chuyển hóa của GRON, phương pháp bao gồm các bước:

đưa GRON vào thể nguyên sinh thực vật biểu hiện trình tự ADN đích mã hóa protein huỳnh quang xanh lam, trong đó GRON được cấu tạo để làm đột biến trình tự ADN đích tại một vị trí được xác định trước để gây ra hiện tượng chuyển hóa protein huỳnh quang xanh lam nhờ đó protein huỳnh quang xanh lam này phát ra huỳnh quang ở một bước sóng khác, trong đó trước khi hoặc đồng thời với việc đưa GRON vào, ADN trong thể nguyên sinh được cho tiếp xúc với một hoặc nhiều nickaza đặc hiệu vị trí để đưa các điểm gián đoạn sợi đơn vào trình tự ADN đích trong vị trí được nhắm đích bởi GRON; và

xác định hiệu quả của việc chuyển hóa.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó một hoặc nhiều nickaza đặc hiệu vị trí được chọn từ TALEN nickaza, nickaza ngón tay kẽm và meganucleaza nickaza.

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó trình tự ADN đích có mặt trong ADN nhiễm sắc thể của thể nguyên sinh.

11. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó trình tự ADN đích có mặt trong plasmit.

12. Phương pháp theo một trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó một hoặc nhiều nickaza đặc hiệu vị trí đem lại hiệu quả chuyển hóa tăng so với hiệu quả được xác định đối với GRON khi không có mặt một hoặc nhiều nickaza.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CIBUS US LLC
CIBUS EUROPE B.V.

<120> Phương pháp đưa đột biến do oligonucleobazo sửa chữa gen (GRON) gây ra vào trình tự ADN đích trong tế bào thực vật

<130> CIBUS-026-PCT

<140> PCT/US2014/029621

<141> 2014-03-14

<150> 61/801,320

<151> 2013-03-15

<160> 6

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả về trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 1

vccctcgtga ccaccttcac ctacggcgtg cagtgcttca gch

43

<210> 2

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả về trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 2

vgctgaagca ctgcacgccg taggtgaagg tggtcacgag ggh

43

<210> 3

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả về trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 3

vccctcgtga ccaccttcac ccacggcgtg cagtgcttca gch

43

<210> 4

<211> 43

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả về trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<400> 4

vgctgaagca ctgcacgccg tgggtgaagg tggtcacgag ggh

43

<210> 5

<211> 78

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả về trình tự nhân tạo: Oligonucleotit tổng hợp

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(78)

<400> 5

ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc acc cac ggc gtg cag
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr His Gly Val Gln
1 5 10 15

48

tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag
Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
20 25

78

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mô tả về trình tự nhân tạo: Peptit tổng hợp

<400> 6

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Thr His Gly Val Gln
1 5 10 15

Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
20 25