



(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)



1-0045209

(51)^{2020.01} C07H 21/04; C12N 15/00

(13) B

(21) 1-2021-04049

(22) 11/03/2014

(62) 1-2015-03725

(86) PCT/US2014/023648 11/03/2014

(87) WO2014/159434 02/10/2014

(30) 61/785,268 14/03/2013 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/08/2021 401A

(71) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

800 North Lindbergh Blvd., St. Louis, MO 63167, United States of America

(72) CHITTOOR, Jaishree, M. (US); MIYAMOTO, Amy, J. (US); NICHOLS, Amy, M. (US); OUFATTOLE, Mohammed (US); PETERSEN, Michael, W. (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP MANG YẾU TỐ ĐIỀU HÒA ĐẶC TÍNH DUNG NẠP THUỐC DIỆT CỎ VÀ KHÁNG VẬT GÂY HẠI Ở THỰC VẬT, THỰC VẬT CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM HÀNG HÓA VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC VẬT CHUYỂN GEN

(21) 1-2021-04049

(57) Sáng chế đề xuất phân tử và cấu trúc ADN tái tổ hợp, cũng như trình tự nucleotit của chúng, hữu dụng để điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật. Sáng chế còn đề xuất thực vật chuyển gen, tế bào của thực vật chuyển gen, phần của thực vật chuyển gen, và hạt chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài và phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến lĩnh vực sinh học phân tử thực vật, thiết kế di truyền thực vật, và phân tử ADN hữu dụng để điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Yếu tố điều hòa là yếu tố di truyền mà điều hòa hoạt tính của gen bằng cách điều biến sự phiên mã của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết linh hoạt. Yếu tố này có thể bao gồm trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, intron, và vùng không dịch mã 3' và có thể được dùng trong lĩnh vực sinh học phân tử thực vật và thiết kế di truyền thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất yếu tố điều hòa mới để dùng ở thực vật, và cấu trúc chứa yếu tố điều hòa này. Sáng chế còn đề xuất tế bào của thực vật, thực vật, và hạt chuyển gen chứa yếu tố điều hòa này. Theo một phương án được bộc lộ trong bản mô tả này, yếu tố điều hòa liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã. Theo các phương án nhất định, phân tử ADN có thể phiên mã là khác loài đối với trình tự điều hòa. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất và sử dụng yếu tố điều hòa được bộc lộ trong bản mô tả này, bao gồm cấu trúc chứa yếu tố điều hòa, và tế bào của thực vật, thực vật, và hạt chuyển gen chứa yếu tố điều hòa này liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã mà là khác loài đối với yếu tố điều hòa.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 85 phần trăm so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37; (b) trình tự ADN chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 1 đến 37; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự ADN liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài. “Phân tử ADN có thể phiên mã khác loài” nghĩa là phân tử ADN có thể phiên mã là khác loài đối với trình tự ADN mà nó liên kết linh hoạt với. Theo các phương án cụ thể, phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 90 phần trăm, ít nhất 91 phần trăm, ít nhất 92 phần trăm, ít nhất 93 phần trăm, ít nhất 94 phần trăm, ít nhất 95 phần trăm, ít nhất 96 phần trăm, ít nhất 97 phần trăm, ít nhất 98 phần trăm, hoặc ít nhất 99 phần trăm so với trình tự ADN bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37. Theo các phương án cụ thể, phân tử ADN có thể phiên mã khác loài chứa gen đáng quan tâm về mặt nông học, như gen có khả năng tạo ra tính kháng cỏ hoặc tính kháng vật gây hại ở thực vật. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất cấu trúc chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào của thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 85 phần trăm so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37; (b) trình tự ADN chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự ADN liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài. Theo các phương án nhất định, tế bào của thực vật chuyển gen là tế bào của cây một lá mầm. Theo các phương án khác, tế bào của thực vật chuyển gen là tế bào của cây hai lá mầm.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề xuất thực vật chuyển gen, hoặc một phần của chúng, chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: a) trình tự ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 85 phần trăm so với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37; b) trình tự ADN chứa trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37; và c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37, trong đó đoạn này có hoạt

tính điều hòa gen; trong đó trình tự ADN liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài. Theo các phương án cụ thể, thực vật chuyển gen là thực vật thể hệ con thuộc thể hệ bất kỳ đối với thực vật chuyển gen ban đầu và chứa phân tử ADN tái tổ hợp. Hạt chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp mà tạo ra thực vật chuyển gen này khi lớn lên cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa bao gồm bước thu thực vật chuyển gen hoặc một phần của chúng chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế và sản xuất sản phẩm hàng hóa từ đó. Theo một phương án, sản phẩm hàng hóa là hạt đã được xử lý, hạt, phần của thực vật, và bột xay thô.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế bao gồm bước biến nạp tế bào của thực vật bằng phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế để tạo ra tế bào của thực vật đã được biến nạp và phục hồi thực vật chuyển gen từ tế bào của thực vật đã được biến nạp này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

HÌNH 1: Thể hiện các cấu hình catxet biểu hiện theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt về các trình tự

SEQ ID NO: 1 đến 30, 38 đến 41, 49 và 56 là các trình tự UTR 3'.

SEQ ID NO: 31, 35, 42, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54 và 55 là các trình tự ADN của các nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa (regulatory expression element group - EXP) chứa trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt 5' với trình tự dẫn đầu, mà liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự intron; hoặc trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự dẫn đầu.

SEQ ID NO: 32, 36, và 43 là các trình tự khởi đầu.

SEQ ID NO: 33 và 37 là các trình tự dẫn đầu.

SEQ ID NO: 34 là trình tự intron.

SEQ ID NO: 44 là trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS) mà mang intron có thể xử lý.

SEQ ID NO: 45 và 46 là các trình tự mã hóa luxiferaza.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen ở thực vật. Các trình tự nucleotit của các phân tử ADN này được nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37. Các phân tử ADN này có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt ở mô thực vật, và do đó điều hòa sự biểu hiện gen của gen chuyển liên kết linh hoạt ở thực vật chuyển gen. Sáng chế còn đề xuất phương pháp cải biến, tạo ra, và sử dụng chúng. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm mà chứa tế bào của thực vật chuyển gen, thực vật chuyển gen, phần của thực vật chuyển gen, và hạt chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế, và phương pháp sản xuất và sử dụng chúng.

Các định nghĩa và các phương pháp sau được đưa ra để xác định rõ hơn sáng chế và để hướng dẫn chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện sáng chế. Trừ khi nêu rõ khác, các thuật ngữ cần được hiểu theo cách dùng thông thường bởi chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan.

Phân tử ADN

Như được dùng trong bản mô tả này, các thuật ngữ “ADN” hoặc “phân tử ADN” chỉ phân tử ADN sợi kép có nguồn gốc từ hệ gen hoặc nguồn gốc tổng hợp, tức là polyme của bazơ deoxyribonucleotit. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự ADN” chỉ trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp dùng trong bản mô tả này tương ứng với danh pháp nêu trong Mục 37 của Mã trong Quy định Liên Bang Hoa Kỳ (the United States Code of Federal Regulations) § 1.822, và nêu trong các bảng trong Tiêu chuẩn WIPO ST.25 (1998), Phụ lục 2, bảng 1 và bảng 3.

Thuật ngữ “phân tử ADN tái tổ hợp” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử ADN chứa hỗn hợp của các phân tử ADN mà không có trong tự nhiên cùng với nhau nếu không có sự can thiệp của con người. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp có thể là phân tử ADN chứa ít nhất hai phân tử ADN khác loài đối với nhau, phân tử ADN mà

chứa trình tự ADN có nguồn gốc từ các trình tự ADN có trong tự nhiên, hoặc phân tử ADN đã được đưa vào ADN của tế bào chủ bằng cách biến nạp di truyền.

Thuật ngữ “mức độ tương đồng trình tự” được dùng trong bản mô tả này để chỉ mức độ giống nhau của hai trình tự ADN được sắp thẳng hàng tối ưu. Sự sắp thẳng hàng trình tự tối ưu được tạo ra bằng cách sắp thẳng hàng thủ công hai trình tự, ví dụ, trình tự quy chiếu và trình tự ADN khác, để tối đa hóa số lượng cặp đôi nucleotit trong việc sắp thẳng hàng trình tự với các chỗ cài xen, làm khuyết, hoặc khoảng trống nucleotit trong thích hợp. Thuật ngữ “trình tự quy chiếu” được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự ADN nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37.

Các thuật ngữ “phần trăm mức độ tương đồng về trình tự” hoặc “mức độ tương đồng tính theo phần trăm” hoặc “% mức độ tương đồng” được dùng trong bản mô tả này là tỷ lệ tương đồng nhân với 100. “Tỷ lệ tương đồng” đối với trình tự ADN đã được sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự quy chiếu là số lượng cặp đôi nucleotit trong việc sắp thẳng hàng tối ưu, chia cho tổng số nucleotit trong trình tự quy chiếu hoàn chỉnh. Do đó, theo một phương án sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa trình tự ADN mà, khi được sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự quy chiếu, nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37 của bản mô tả sáng chế này dưới dạng, có mức độ tương đồng ít nhất khoảng 85 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 86 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 87 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 88 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 89 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 90 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 91 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 92 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 93 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 94 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 95 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 96 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 97 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 98 phần trăm, mức độ tương đồng ít nhất khoảng 99 phần trăm, hoặc mức độ tương đồng ít nhất khoảng 100 phần trăm so với trình tự quy chiếu.

Yếu tố điều hòa

Yếu tố điều hòa như trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, gen tăng cường, intron, và vùng kết thúc phiên mã (hoặc UTR 3') đóng vai trò là một phần không tách rời trong sự biểu hiện tổng thể của gen trong tế bào sống. Thuật ngữ “yếu tố điều hòa” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen. Thuật ngữ “hoạt tính điều hòa gen” được dùng trong bản mô tả này để chỉ khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt, ví dụ bằng cách ảnh hưởng đến sự phiên mã và/hoặc sự dịch mã của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Do đó, yếu tố điều hòa, như trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, gen tăng cường, intron và UTR 3' hoạt động ở thực vật hữu dụng để cải biến kiểu hình thực vật thông qua việc thiết kế di truyền.

Thuật ngữ trình tự “nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa” hoặc trình tự “EXP” được dùng trong bản mô tả này có thể chỉ nhóm của các yếu tố điều hòa liên kết linh hoạt, như gen tăng cường, trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, và intron. Do đó, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa có thể bao gồm, ví dụ, trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự dẫn đầu, mà về phần mình liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự intron.

Yếu tố điều hòa có thể đặc trưng bởi kiểu biểu hiện gen của chúng, ví dụ, tác dụng dương tính và/hoặc âm tính như sự biểu hiện về cấu trúc, thời gian, không gian, phát triển, mô, môi trường, sinh lý, bệnh lý, chu kỳ tế bào, và/hoặc đáp ứng về mặt hóa học, và sự kết hợp của các tác dụng này theo cách bất kỳ, cũng như bởi dấu hiệu định lượng hoặc định tính. Như được dùng trong bản mô tả này, “kiểu biểu hiện gen” là kiểu bất kỳ của sự phiên mã của phân tử ADN liên kết linh hoạt thành phân tử ARN đã được phiên mã. Phân tử ARN đã được phiên mã có thể được dịch mã để tạo ra phân tử protein hoặc có thể tạo ra phân tử ARN đối nghĩa hoặc phân tử ARN điều hòa khác, như ARN sợi kép (dsRNA), ARN vận chuyển (tRNA), ARN ribosom (rRNA), microARN (miRNA), và các phân tử tương tự.

Thuật ngữ “sự biểu hiện protein” được dùng trong bản mô tả này là kiểu bất kỳ của sự dịch mã của phân tử ARN đã được phiên mã thành phân tử protein. Sự biểu hiện

protein có thể đặc trưng bởi đặc tính về thời gian, không gian, phát triển, hoặc hình thái của nó, cũng như bởi dấu hiệu định lượng hoặc định tính.

Trình tự khởi đầu hữu dụng để làm yếu tố điều hòa nhằm điều biến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Thuật ngữ “trình tự khởi đầu” được dùng trong bản mô tả này nói chung chỉ phân tử ADN tham gia vào sự nhận biết và liên kết của ARN polymeraza II và các protein khác, như các yếu tố phiên mã giao dịch, để khởi đầu sự phiên mã. Trình tự khởi đầu có thể xác định được ban đầu từ vùng không dịch mã 5' (UTR 5') của gen. Theo cách khác, trình tự khởi đầu có thể là phân tử ADN được tạo ra hoặc được điều chỉnh bằng cách tổng hợp. Trình tự khởi đầu còn có thể là trình tự khảm. Trình tự khởi đầu khảm được tạo ra bằng cách dung hợp hai hoặc nhiều phân tử ADN khác loài. Trình tự khởi đầu hữu dụng trong việc thực hiện sáng chế bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 36, bao gồm các đoạn hoặc các biến thể của chúng. Theo phương án cụ thể của sáng chế, phân tử ADN được yêu cầu bảo hộ và biến thể hoặc chất dẫn xuất bất kỳ của chúng như được bộc lộ trong bản mô tả này, được xác định thêm là có hoạt tính của trình tự khởi đầu, tức là có khả năng hoạt động như trình tự khởi đầu ở tế bào chủ, như ở thực vật chuyển gen. Theo các phương án cụ thể khác nữa, đoạn có thể được xác định là thể hiện hoạt tính của trình tự khởi đầu mang bởi phân tử của trình tự khởi đầu ban đầu mà nó thu được từ đó, hoặc đoạn có thể bao gồm “trình tự khởi đầu tối thiểu” mà tạo ra mức độ phiên mã cơ bản và cấu thành bởi hộp TATA hoặc trình tự ADN tương đương để nhận biết và liên kết phức hợp ARN polymeraza II nhằm khởi đầu sự phiên mã.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất các đoạn của trình tự khởi đầu được bộc lộ trong bản mô tả này. Các đoạn của trình tự khởi đầu có thể có hoạt tính của trình tự khởi đầu, như được mô tả trên đây, và có thể là hữu dụng khi dùng riêng rẽ hoặc kết hợp với trình tự khởi đầu và đoạn của trình tự khởi đầu khác, như trong trình tự khởi đầu khảm cấu trúc, hoặc kết hợp với EXP và đoạn EXP khác. Theo các phương án cụ thể, các đoạn của trình tự khởi đầu được đề xuất chứa ít nhất khoảng 50, ít nhất khoảng 75, ít nhất khoảng 95, ít nhất khoảng 100, ít nhất khoảng 125, ít nhất khoảng 150, ít nhất khoảng 175, ít nhất khoảng 200, ít nhất khoảng 225, ít nhất khoảng 250, ít nhất khoảng 275, ít

nhất khoảng 300, ít nhất khoảng 500, ít nhất khoảng 600, ít nhất khoảng 700, ít nhất khoảng 750, ít nhất khoảng 800, ít nhất khoảng 900, hoặc ít nhất khoảng 1000 nucleotit liền kề, hoặc dài hơn, của phân tử ADN có hoạt tính của trình tự khởi đầu như được bộc lộ trong bản mô tả này. Phương pháp sản xuất các đoạn này từ phân tử của trình tự khởi đầu ban đầu là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Chế phẩm thu được từ trình tự khởi đầu bất kỳ được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 36, như sự làm khuyết bên trong hoặc làm khuyết ở đầu tận cùng 5', ví dụ, có thể được tạo ra bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để cải thiện hoặc làm thay đổi sự biểu hiện, bao gồm cách loại bỏ các yếu tố mà có tác dụng dương tính hoặc âm tính đối với sự biểu hiện; nhân đôi các yếu tố mà có tác dụng dương tính hoặc âm tính đối với sự biểu hiện; và/hoặc nhân đôi hoặc loại bỏ các yếu tố mà có tác dụng đặc hiệu với mô hoặc tế bào đối với sự biểu hiện. Các chế phẩm thu được từ trình tự khởi đầu bất kỳ được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 36 có sự làm khuyết ở đầu tận cùng 3' trong đó yếu tố hộp TATA hoặc trình tự tương đương của chúng và trình tự nằm sau được loại bỏ có thể được áp dụng, ví dụ, để tạo ra yếu tố tăng cường. Việc làm khuyết thêm nữa có thể được thực hiện để loại bỏ yếu tố bất kỳ mà có tác dụng dương tính hoặc âm tính; tác dụng đặc hiệu với mô; tác dụng đặc hiệu với tế bào; hoặc tác dụng đặc hiệu thời điểm (như, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhịp sinh học ngày đêm) đối với sự biểu hiện. Trình tự khởi đầu bất kỳ được thể hiện trong SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 36 và các đoạn hoặc gen tăng cường thu được từ đó có thể được dùng để tạo ra chế phẩm chứa yếu tố điều hòa phiên mã khả năng.

Theo sáng chế, trình tự khởi đầu hoặc đoạn của trình tự khởi đầu có thể được phân tích về sự có mặt của các yếu tố của trình tự khởi đầu đã biết, tức là các đặc điểm của trình tự ADN, như hộp TATA và môtip các vị trí liên kết các yếu tố phiên mã đã biết khác. Việc xác định các yếu tố của trình tự khởi đầu đã biết này có thể được áp dụng bởi chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để thiết kế các biến thể của trình tự khởi đầu có kiểu biểu hiện tương tự với trình tự khởi đầu ban đầu.

Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “trình tự dẫn đầu” chỉ phân tử ADN xác định được từ vùng 5' không dịch mã (UTR 5') của gen và xác định được là

đoạn nucleotit ở giữa vị trí bắt đầu phiên mã (TSS) và vị trí bắt đầu trình tự mã hóa protein. Theo cách khác, trình tự dẫn đầu có thể là yếu tố ADN được tạo ra hoặc được điều chỉnh bằng cách tổng hợp. Trình tự dẫn đầu có thể được dùng làm yếu tố điều hòa đầu tận cùng 5' để điều biến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Phân tử dẫn đầu có thể được dùng với trình tự khởi đầu khác loài hoặc với trình tự khởi đầu tự nhiên của chúng. Trình tự dẫn đầu hữu dụng trong việc thực hiện sáng chế bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 37 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án cụ thể, các trình tự ADN này có thể được xác định là có khả năng hoạt động như là trình tự dẫn đầu ở tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, tế bào của thực vật chuyển gen. Theo một phương án, các trình tự ADN này có thể được giải mã vì chứa hoạt tính của trình tự dẫn đầu.

Các trình tự dẫn đầu được thể hiện trong SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 37 có thể cấu thành bởi yếu tố điều hòa, hoặc có thể chọn cấu trúc thứ cấp mà có thể có tác dụng đối với sự phiên mã hoặc sự dịch mã của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Các trình tự dẫn đầu được thể hiện trong SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 37 có thể được sử dụng theo sáng chế để tạo ra yếu tố điều hòa khả năng mà ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc sự dịch mã của phân tử ADN liên kết linh hoạt.

Thuật ngữ “intron” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN mà có thể được xác định từ gen và nói chung có thể xác định được là vùng bị cắt ra khi ARN thông tin (mARN) xử lý trước khi dịch mã. Theo cách khác, intron có thể là yếu tố ADN được tạo ra hoặc được điều chỉnh bằng cách tổng hợp. Intron có thể chứa yếu tố tăng cường mà ảnh hưởng đến sự phiên mã của gen liên kết linh hoạt. Intron có thể được dùng làm yếu tố điều hòa để điều biến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Cấu trúc có thể chứa intron, và intron có thể là khác loài hoặc không khác loài đối với phân tử ADN có thể phiên mã. Các ví dụ về intron trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm intron actin của cây lúa và intron HSP70 của cây ngô.

Ở thực vật, việc đưa vào một số intron trong cấu trúc gen dẫn đến mức tích lũy ARN thông tin và protein tăng so với cấu trúc thiếu intron. Hiệu quả này được gọi là “sự tăng cường bằng intron” (intron mediated enhancement - IME) của mức độ biểu hiện gen.

Các intron kích thích sự biểu hiện ở thực vật đã biết đã được xác định ở gen ngô (ví dụ, *tubA1*, *Adh1*, *Sh1*, và *Ubi1*), ở gen lúa (ví dụ, *tpi*) và ở gen của cây hai lá mầm như gen của cây dã yên thảo (ví dụ, *rbcS*), cây khoai tây (ví dụ, *st-ls1*) và của *Arabidopsis thaliana* (ví dụ, *ubq3* và *pat1*). Đã phát hiện ra rằng sự làm khuyết hoặc đột biến ở vị trí tách intron làm giảm mức độ biểu hiện gen, cho thấy rằng việc tách có thể là cần thiết đối với IME. Tuy nhiên, IME ở cây hai lá mầm đã được thể hiện bởi sự đột biến điểm ở vị trí tách intron của gen *pat1* ra khỏi *A. thaliana*. Việc sử dụng nhiều lần của cùng một intron trong một thực vật đã bộc lộ nhược điểm trong các trường hợp nhất định. Trong các trường hợp này, cần phải có tập hợp các yếu tố kiểm soát cơ bản để xây dựng các yếu tố ADN tái tổ hợp thích hợp.

Các intron hữu dụng trong việc thực hiện sáng chế bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34. Các chế phẩm thu được từ intron được thể hiện trong SEQ ID NO: 34 có thể có sự làm khuyết nội phân tử hoặc sự nhân đôi của yếu tố điều hòa *cis*; và/hoặc sự biến đổi của các trình tự ADN ở đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' chứa mỗi tách intron/exon có thể được dùng để cải thiện sự biểu hiện hoặc tính đặc hiệu của sự biểu hiện khi liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu + trình tự dẫn đầu hoặc trình tự khởi đầu + trình tự dẫn đầu khảm và trình tự mã hóa. Khi cải biến trình tự biên intron/exon, có thể có lợi nếu tránh sử dụng trình tự nucleotit AT hoặc nucleotit A lần lượt ngay trước đầu tận cùng 5' của vị trí tách intron (GT) và nucleotit G hoặc trình tự nucleotit TG, ngay sau đầu tận cùng 3' của vị trí tách intron (AG) để tránh khả năng tạo ra các codon khởi đầu không mong muốn trong khi xử lý ARN thông tin thành sản phẩm phiên mã cuối cùng. Do đó, trình tự ADN xung quanh vị trí tách intron ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' có thể được cải biến theo cách này. Intron và biên thể intron đã được thay đổi như được bộc lộ trong bản mô tả này và nhờ các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được thử nghiệm theo kinh nghiệm như được bộc lộ trong các ví dụ thực hiện để xác định tác động của intron đến sự biểu hiện của phân tử ADN liên kết linh hoạt. Sự thay đổi của các đầu tận cùng 5' và đầu tận cùng 3' chứa mỗi tách intron/exon cũng có thể được tạo ra để làm giảm khả năng tạo ra các codon khởi đầu và codon kết thúc trong sản phẩm phiên mã thu được sau khi xử lý và tách intron của ARN thông tin. Các intron

có thể được thử nghiệm theo kinh nghiệm như được bộc lộ trong ví dụ thực hiện sáng chế để xác định tác động của intron đến sự biểu hiện của gen chuyển.

Các thuật ngữ “phân tử kết thúc phiên mã ở đầu tận cùng 3’”, “vùng không dịch mã ở đầu tận cùng 3’” hoặc “UTR 3’” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN mà được dùng khi phiên mã thành vùng không dịch mã của phần 3’ của phân tử ARN thông tin. Vùng không dịch mã 3’ của phân tử ARN thông tin có thể được tạo ra bằng cách phân cắt đặc hiệu và sự polyadenyl hóa 3’, còn được gọi là đuôi polyA. UTR 3’ có thể liên kết linh hoạt và nằm sau với phân tử ADN có thể phiên mã và có thể bao gồm tín hiệu polyadenyl hóa và các tín hiệu điều hòa khác có khả năng ảnh hưởng đến sự phiên mã, việc xử lý ARN thông tin, hoặc mức độ biểu hiện gen. Đuôi polyA được tin là có chức năng làm ổn định ARN thông tin và trong sự khởi đầu dịch mã. Các ví dụ về các phân tử kết thúc phiên mã 3’ trong lĩnh vực kỹ thuật này là vùng 3’ nopal synthase; vùng 3’ hsp17 của lúa mì, vùng 3’ của cấu trúc siêu phân tử nhỏ của pea rubisco, vùng 3’ E6 của bông, và UTR 3’ của coixin.

UTR 3’ thường được cho là hữu hiệu để biểu hiện tái tổ hợp phân tử ADN cụ thể. UTR 3’ yếu có khả năng gây ra sự đọc hết, mà có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của phân tử ADN nằm trong catxet biểu hiện bên cạnh. Việc kiểm soát thích hợp đối với sự kết thúc phiên mã có thể ngăn chặn sự đọc hết các trình tự ADN (ví dụ, catxet biểu hiện khác) nằm sau và có thể còn cho phép tuần hoàn một cách hữu hiệu ARN polymeraza để cải thiện mức độ biểu hiện gen. Sự kết thúc một cách hữu hiệu sự phiên mã (sự giải phóng ARN polymeraza II ra khỏi ADN) là điều kiện tiên quyết để bắt đầu lại sự phiên mã và bằng cách đó ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ phiên mã tổng thể. Sau khi kết thúc phiên mã, ARN thông tin thành thực được giải phóng ra khỏi vị trí tổng hợp và khuôn được vận chuyển vào tế bào chất. ARN thông tin của sinh vật nhân chuẩn được tích lũy dưới dạng poly(A) *in vivo*, khiến cho khó phát hiện vị trí kết thúc phiên mã theo các phương pháp thông thường. Tuy nhiên, việc dự đoán UTR 3’ hoạt động và hữu hiệu bằng các phương pháp thông tin sinh học có thể khó vì có ít trình tự ADN bảo toàn cho phép dự đoán dễ dàng UTR 3’ hữu hiệu.

Từ quan điểm thực tế, thường có lợi nếu UTR 3' được dùng trong catxet biểu hiện có các đặc tính sau. UTR 3' cần có khả năng kết thúc một cách có hiệu lực và có hiệu quả sự phiên mã của gen chuyển và ngăn chặn sự đọc hết của sản phẩm phiên mã vào trình tự ADN bên cạnh bất kỳ, mà có thể cấu thành bởi catxet biểu hiện khác như trong trường hợp có nhiều catxet biểu hiện có mặt trong một ADN vận chuyển (T-ADN), hoặc ADN nhiễm sắc thể bên cạnh mà T-AND đã được cài xen vào đó. Trong công nghệ sinh học thực vật, UTR 3' thường được sử dụng để mỗi phản ứng khuếch đại của ARN phiên mã ngược chiết được từ thực vật đã được biến nạp và được sử dụng để: (1) đánh giá hoạt tính phiên mã hoặc mức độ biểu hiện của catxet biểu hiện ngay khi được đưa vào nhiễm sắc thể của thực vật; (2) đánh giá số lượng bản sao cài xen trong ADN của thực vật; và (3) đánh giá tình trạng tiếp hợp giao tử của hạt thu được sau khi nhân giống. UTR 3' còn được dùng trong phản ứng khuếch đại của ADN chiết được từ thực vật đã được biến nạp để xác định đặc điểm của tình trạng nguyên vẹn của catxet đã được cài xen.

Thuật ngữ “gen tăng cường” hoặc “yếu tố tăng cường” được dùng trong bản mô tả này để chỉ yếu tố điều hòa tác động *cis*, còn được gọi là yếu tố *cis*, mà cấu thành một khía cạnh của kiểu biểu hiện tổng thể, nhưng thường một mình thì không đủ để tiến hành phiên mã, của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Không giống như trình tự khởi đầu, yếu tố tăng cường thường không có vị trí bắt đầu phiên mã (TSS) hoặc hộp TATA hoặc trình tự ADN tương đương. Trình tự khởi đầu hoặc đoạn của trình tự khởi đầu tất nhiên có thể chứa một hoặc nhiều yếu tố tăng cường mà ảnh hưởng đến sự phiên mã của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt. Yếu tố tăng cường còn có thể được ngưng tụ với trình tự khởi đầu để tạo ra yếu tố *cis* của trình tự khởi đầu khảm, mà cấu thành một khía cạnh của sự điều biến tổng thể của sự biểu hiện gen.

Nhiều yếu tố tăng cường trình tự khởi đầu được tin rằng để liên kết các protein liên kết với ADN và/hoặc ảnh hưởng đến cấu trúc liên kết với ADN, tạo ra cấu hình cục bộ mà cho phép hoặc hạn chế một cách chọn lọc sự tiếp cận của ARN polymeraza với khuôn ADN hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho việc mở chọn lọc xoắn kép ở vị trí bắt đầu phiên mã. Yếu tố tăng cường có thể hoạt động để liên kết các yếu tố phiên mã nhằm điều hòa sự phiên mã. Một số yếu tố tăng cường liên kết với nhiều yếu tố phiên mã, và các yếu

tổ phiên mã có thể tương tác với ái lực khác nhau với nhiều hơn một miền gen tăng cường. Yếu tố tăng cường có thể được xác định bằng nhiều kỹ thuật, bao gồm phân tích làm khuyết, tức là làm khuyết một hoặc nhiều nucleotit từ đầu tận cùng 5' hoặc ở bên trong đối với trình tự khởi đầu; phân tích protein liên kết với ADN bằng cách sử dụng đầu chân ADNaza I, sự can thiệp metyl hóa, thử nghiệm tính di động-dịch chuyển điện di, đầu chân hệ gen *in vivo* bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction - PCR) thông qua sự ghép nối, và các thử nghiệm thông thường khác; hoặc bằng cách phân tích mức độ tương tự trình tự ADN bằng cách sử dụng môtip yếu tố *cis* hoặc yếu tố tăng cường đã biết làm trình tự đích hoặc môtip đích với các phương pháp so sánh trình tự ADN thông thường, như phương pháp BLAST. Cấu trúc tinh vi của miền gen tăng cường có thể được nghiên cứu thêm bằng cách gây đột biến (hoặc thay thế) một hoặc nhiều nucleotit hoặc theo các phương pháp thông thường khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Yếu tố tăng cường có thể thu được theo phương pháp tổng hợp hóa học hoặc bằng cách phân lập ra khỏi yếu tố điều hòa chứa yếu tố này, và chúng có thể được tổng hợp với nucleotit biên bổ sung mà chứa vị trí enzyme giới hạn hữu dụng để tạo điều kiện thuận lợi cho việc thao tác tiếp theo. Do đó, thiết kế, cấu trúc, và việc sử dụng yếu tố tăng cường theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này để điều biến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt nằm trong phạm vi của sáng chế này.

Thuật ngữ “khảm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN đơn lẻ được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, khi phân tử ADN thứ nhất hoặc phân tử ADN thứ hai không thường được tìm thấy trong cấu hình đó, tức là được ngưng tụ với nhau. Do đó, phân tử ADN khảm là phân tử ADN mới không thường tìm thấy trong tự nhiên. Thuật ngữ “trình tự khởi đầu khảm” được dùng trong bản mô tả này để chỉ trình tự khởi đầu được tạo ra bằng cách thao tác phân tử ADN. Trình tự khởi đầu khảm có thể kết hợp hai hoặc nhiều đoạn ADN, ví dụ, dung hợp trình tự khởi đầu với yếu tố tăng cường. Do đó, thiết kế, cấu trúc, và việc sử dụng trình tự khởi đầu khảm theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này để điều biến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt nằm trong phạm vi của sáng chế này.

Thuật ngữ “biến thể” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN thứ hai, như yếu tố điều hòa, mà trong chế phẩm tương tự với, nhưng không giống hệt với, phân tử ADN thứ nhất, và trong đó phân tử ADN thứ hai vẫn duy trì chức năng chung, tức là kiểu biểu hiện giống hoặc tương tự, ví dụ thông qua hoạt tính phiên mã hoặc dịch mã cao hơn hoặc thấp hơn hoặc tương đương, của phân tử ADN thứ nhất. Biến thể có thể là phiên bản ngắn hơn hoặc bị cắt cụt của phân tử ADN thứ nhất và/hoặc phiên bản đã được biến đổi của trình tự của phân tử ADN thứ nhất, như phiên bản có vị trí enzym giới hạn và/hoặc sự làm khuyết nội phân tử, sự thay thế, và/hoặc sự cài xen. “Biến thể” còn có thể bao gồm yếu tố điều hòa có trình tự nucleotit chứa sự thay thế, sự làm khuyết, và/hoặc sự cài xen của một hoặc nhiều nucleotit của trình tự quy chiếu, trong đó yếu tố điều hòa dẫn xuất có hoạt tính phiên mã hoặc dịch mã cao hơn hoặc thấp hơn hoặc tương đương so với phân tử điều hòa bố mẹ tương ứng. “Biến thể” yếu tố điều hòa cũng bao gồm biến thể sinh ra từ đột biến xảy ra trong quá trình hoặc nhờ sự biến nạp tế bào vi khuẩn và tế bào của thực vật. Theo sáng chế, trình tự ADN nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37 có thể được dùng để tạo ra biến thể mà tương tự trong chế phẩm, nhưng không giống hệt với, trình tự ADN của yếu tố điều hòa ban đầu, trong khi vẫn duy trì chức năng chung, tức là kiểu biểu hiện giống hoặc tương tự, của yếu tố điều hòa ban đầu. Việc tạo ra biến thể này theo sáng chế cũng thuộc kỹ năng của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này theo hướng dẫn của bản mô tả này và thuộc phạm vi của sáng chế.

Yếu tố điều hòa khảm có thể được thiết kế để chứa nhiều yếu tố kết cấu mà có thể được liên kết linh hoạt theo các phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như cắt và ghép nối bằng enzym giới hạn, tách dòng không phụ thuộc vào việc nối, lắp ráp khối kết cấu của các sản phẩm PCR trong khi khuếch đại, hoặc tổng hợp hóa học trực tiếp yếu tố điều hòa, cũng như các phương pháp đã biết khác trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nhiều yếu tố điều hòa khảm thu được có thể chứa các yếu tố kết cấu giống nhau, hoặc các biến thể của chúng, nhưng khác trong trình tự ADN hoặc các trình tự ADN chứa trình tự hoặc các trình tự ADN liên kết mà cho phép các phân cấu tạo được liên kết một cách linh hoạt. Theo sáng chế, trình tự ADN nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 30 hoặc 31 đến 37 có thể tạo ra trình tự quy chiếu của yếu tố điều hòa, trong đó các yếu tố kết cấu

chứa trình tự quy chiếu có thể được kết hợp theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm sự thay thế, sự làm khuyết, và/hoặc sự cài xen của một hoặc nhiều nucleotit hoặc đột biến có trong tự nhiên trong thể biến nạp tế bào vi khuẩn và tế bào của thực vật.

Hiệu quả của sự cải biến, sự nhân đôi, hoặc sự làm khuyết được bộc lộ trong bản mô tả này lên các khía cạnh biểu hiện mong muốn của phân tử ADN có thể phiên mã cụ thể có thể được thử nghiệm theo kinh nghiệm trong thử nghiệm thực vật ổn định và nhất thời, như các thử nghiệm đã được bộc lộ trong các ví dụ thực hiện sáng chế trong bản mô tả này, để xác nhận các kết quả, mà có thể thay đổi tùy theo sự thay đổi được tạo ra và mục đích của sự thay đổi về phân tử ADN ban đầu.

Cấu trúc

Thuật ngữ “cấu trúc” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là phân tử ADN tái tổ hợp bất kỳ như plasmit, cosmit, virut, thể thực khuẩn, hoặc phân tử ADN hoặc ARN mạch thẳng hoặc mạch vòng, thu được từ nguồn bất kỳ, có khả năng hợp nhất vào hệ gen hoặc tự sao chép, chứa phân tử ADN trong đó ít nhất một phân tử ADN đã được liên kết với phân tử ADN khác theo cách hoạt động chức năng, tức là liên kết linh hoạt. Thuật ngữ “vật truyền” được dùng trong bản mô tả này có nghĩa là cấu trúc bất kỳ mà có thể được sử dụng đối với mục đích biến nạp, tức là đưa ADN hoặc ARN khác loài vào tế bào chủ. Cấu trúc này thường bao gồm một hoặc nhiều catxet biểu hiện. Thuật ngữ “catxet biểu hiện” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN chứa ít nhất phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều yếu tố điều hòa, thường ít nhất là trình tự khởi đầu và UTR 3’.

Thuật ngữ “liên kết linh hoạt” được dùng trong bản mô tả này để chỉ việc phân tử ADN thứ nhất liên kết với phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất và thứ hai được sắp xếp sao cho phân tử ADN thứ nhất ảnh hưởng đến chức năng của phân tử ADN thứ hai. Hai phân tử ADN này có thể là hoặc không phải là một phần của phân tử ADN liên kết đơn lẻ và có thể là hoặc không phải là lân cận. Ví dụ, trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã nếu trình tự khởi đầu này có khả năng ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của phân tử ADN có thể phiên mã.

Cấu trúc theo sáng chế có thể được cung cấp, theo một phương án, dưới dạng cấu trúc biên plasmid tạo ra khối u (Ti) kép mà có vùng biên phải (RB hoặc AGRtu.RB) và vùng biên trái (LB hoặc AGRtu.LB) của plasmid Ti phân lập được từ *Agrobacterium tumefaciens* chứa T-ADN mà, cùng với các phân tử vận chuyển được cung cấp bởi tế bào *A. tumefaciens*, cho phép T-ADN hợp nhất vào hệ gen của tế bào của thực vật (ví dụ, xem patent Mỹ số 6,603,061). Cấu trúc này còn có thể chứa các đoạn ADN khung xương plasmid mà mang lại chức năng sao chép và sự chọn lọc kháng sinh trong tế bào vi khuẩn, ví dụ, điểm mở đầu sao chép *Escherichia coli* như ori322, điểm mở đầu sao chép giới hạn vật chủ rộng như oriV hoặc oriRi, và vùng mã hóa đối với gen đánh dấu chọn lọc như Spec/Strp mà mã hóa Tn7 aminoglycosit adenyltransferaza (*aadA*) mang lại tính kháng đối với spectinomycin hoặc streptomycin, hoặc gen đánh dấu chọn lọc gentamycin (Gm, Gent). Để biến nạp thực vật, chủng vi khuẩn của vật chủ thường là *A. tumefaciens* ABI, C58, hoặc LBA4404; tuy nhiên, các chủng khác mà chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết để biến nạp thực vật có thể được sử dụng theo sáng chế.

Các phương pháp có trong lĩnh vực kỹ thuật này để lắp ráp và đưa cấu trúc vào tế bào theo cách sao cho phân tử ADN có thể phiên mã được phiên mã thành phân tử ARN thông tin chức năng mà sẽ được dịch mã và được thể hiện ở dạng protein là đã biết. Để thực hiện sáng chế, các chế phẩm và các phương pháp bào chế và các cách sử dụng cấu trúc và các tế bào chủ thông thường là đã biết đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, các vật truyền thông thường hữu dụng để biểu hiện các axit nucleic ở thực vật bậc cao là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm các vật truyền thu được từ plasmid Ti của *Agrobacterium tumefaciens* và vật truyền kiểm soát sự vận chuyển pCaMVCN.

Nhiều yếu tố điều hòa có thể được đưa vào cấu trúc, bao gồm yếu tố điều hòa bất kỳ theo sáng chế. Yếu tố điều hòa bất kỳ có thể được cung cấp trong hỗn hợp với yếu tố điều hòa khác. Hỗn hợp này có thể được thiết kế hoặc được cải biến để tạo ra đặc điểm điều hòa mong muốn. Theo một phương án, cấu trúc theo sáng chế bao gồm ít nhất một yếu tố điều hòa liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt với UTR 3'.

Cấu trúc theo sáng chế có thể bao gồm trình tự khởi đầu hoặc trình tự dẫn đầu bất kỳ theo sáng chế hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể liên kết linh hoạt với trình tự dẫn đầu tận cùng 5' không được dịch mã khác loài như trình tự thu được từ gen protein sốc nhiệt. Theo cách khác, trình tự dẫn đầu theo sáng chế có thể liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu khác loài như trình tự khởi đầu phiên mã 35S của virus khảm súp lơ.

Catxet biểu hiện có thể còn bao gồm trình tự mã hóa peptit vận chuyển mà mã hóa peptit hữu dụng cho việc hướng đích dưới tế bào của protein liên kết linh hoạt, đặc biệt là với lục lạp, lạp vô sắc, hoặc bào quan dạng hạt khác; ty thể; vi thể peroxy; không bào; hoặc vị trí ngoại bào. Nhiều protein nằm trong lục lạp được biểu hiện từ gen trong nhân dưới dạng tiền chất và được hướng đích lục lạp bằng peptit vận chuyển lục lạp (chloroplast transit peptide - CTP). Ví dụ về các protein lục lạp đã phân lập được này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein liên quan đến cấu trúc dưới đơn vị nhỏ (small subunit - SSU) của ribuloza-1,5,-biphosphat carboxylaza, feredoxin, feredoxin oxidoreductaza, protein I và protein II phức thu ánh sáng, thioredoxin F, và enolpyruvyl shikimat phosphat syntaza (EPSPS). Các peptit vận chuyển lục lạp được bộc lộ, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,193,133. Đã chứng minh được rằng các protein không ở trong lục lạp có thể được hướng đích lục lạp bằng sự biểu hiện của CTP khác loài liên kết linh hoạt với phân tử ADN để phiên mã ghi mã các protein không ở trong lục lạp.

Phân tử ADN có thể phiên mã

Thuật ngữ “phân tử ADN có thể phiên mã” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN bất kỳ có khả năng được phiên mã thành phân tử ARN bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử ADN có trình tự mã hóa protein và phân tử ADN tạo ra phân tử ARN có các trình tự hữu dụng để ức chế gen. Loại phân tử ADN có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử ADN từ cùng một thực vật, phân tử ADN từ thực vật khác, phân tử ADN từ sinh vật khác, hoặc phân tử ADN tổng hợp, như phân tử ADN chứa thông tin đối nghĩa của gen, hoặc phân tử ADN ghi mã phiên bản nhân tạo, tổng hợp, hoặc được cải biến theo cách khác của gen chuyển. Phân tử ADN có thể phiên mã làm ví dụ để đưa vào cấu trúc theo sáng chế bao gồm, ví dụ, phân tử ADN hoặc gen từ

loài không phải là loài mà phân tử ADN được đưa vào hoặc gen mà có nguồn gốc từ, hoặc có mặt trong, cùng một loài đó, nhưng được đưa vào tế bào nhận bằng phương pháp thiết kế di truyền chứ không phải là các kỹ thuật nhân giống cổ điển.

“Gen chuyển” được dùng để chỉ phân tử ADN có thể phiên mã khác loài đối với tế bào chủ ít nhất là về vị trí của nó trong hệ gen của tế bào chủ và/hoặc phân tử ADN có thể phiên mã được đưa nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ trong thể hệ hiện tại hoặc thể hệ trước bất kỳ của tế bào.

Yếu tố điều hòa, như trình tự khởi đầu theo sáng chế, có thể liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã mà là khác loài đối với yếu tố điều hòa. Thuật ngữ “khác loài” được dùng trong bản mô tả này để chỉ hỗn hợp của hai hoặc nhiều phân tử ADN khi hỗn hợp này không thường được tìm thấy trong tự nhiên. Ví dụ, hai phân tử ADN có thể thu được từ các loài khác nhau và/hoặc hai phân tử ADN có thể thu được từ các gen khác nhau, ví dụ, các gen khác nhau từ cùng loài hoặc cùng một gen từ các loài khác nhau. Do đó, yếu tố điều hòa là khác loài đối với phân tử ADN có thể phiên mã liên kết linh hoạt nếu hỗn hợp này không thường được tìm thấy trong tự nhiên, tức là phân tử ADN có thể phiên mã không liên kết linh hoạt trong tự nhiên với yếu tố điều hòa.

Phân tử ADN có thể phiên mã thường có thể là phân tử ADN bất kỳ mà mong muốn có sự biểu hiện của sản phẩm phiên mã của nó. Sự biểu hiện của sản phẩm phiên mã có thể dẫn đến sự dịch mã của phân tử ARN thông tin thu được, và do đó dẫn đến sự biểu hiện protein. Theo cách khác, ví dụ, phân tử ADN có thể phiên mã có thể được thiết kế để cuối cùng gây ra sự biểu hiện giảm của gen hoặc protein cụ thể. Theo một phương án, điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phân tử ADN có thể phiên mã mà được định hướng theo hướng đối nghĩa. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này quen thuộc với việc áp dụng công nghệ đối nghĩa. Gen bất kỳ có thể được điều hòa âm theo cách này, và, theo một phương án, phân tử ADN có thể phiên mã có thể được thiết kế để ức chế gen cụ thể thông qua sự biểu hiện của dsARN, siARN hoặc miARN.

Do đó, theo một phương án sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp chứa yếu tố điều hòa theo sáng chế, như phân tử ADN nêu trong SEQ ID NO: 1 đến 37, liên kết linh

hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài để điều biến sự phiên mã của phân tử ADN có thể phiên mã ở mức mong muốn hoặc theo kiểu mong muốn nếu cấu trúc này được hợp nhất trong hệ gen của tế bào của thực vật chuyển gen. Theo một phương án, phân tử ADN có thể phiên mã chứa vùng mã hóa protein của gen và theo phương án khác, phân tử ADN có thể phiên mã chứa vùng đối nghĩa của gen.

Gen đáng quan tâm về mặt nông học

Phân tử ADN có thể phiên mã có thể là gen đáng quan tâm về mặt nông học. Thuật ngữ “gen đáng quan tâm về mặt nông học” được dùng trong bản mô tả này để chỉ phân tử ADN có thể phiên mã mà, khi được biểu hiện trong mô, tế bào, hoặc loại tế bào thực vật cụ thể, mang lại đặc điểm mong muốn. Sản phẩm của gen đáng quan tâm về mặt nông học có thể hoạt động trong thực vật để gây ra tác dụng lên hình thái, sinh lý, sự sinh trưởng, sự phát triển, năng suất, thành phần hạt, tính chất dinh dưỡng, tính kháng bệnh hoặc tính kháng vật gây hại, và/hoặc tính dung nạp môi trường hoặc hóa chất của thực vật hoặc có thể hoạt động như là chất diệt vật gây hại trong thức ăn của vật gây hại mà được nuôi dưỡng bởi thực vật. Theo một phương án của sáng chế, yếu tố điều hòa theo sáng chế được đưa vào cấu trúc sao cho yếu tố điều hòa này được liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã mà là gen đáng quan tâm về mặt nông học. Trong thực vật chuyển gen chứa cấu trúc này, sự biểu hiện của gen đáng quan tâm về mặt nông học có thể mang lại tính trạng nông học có lợi. Tính trạng nông học có lợi có thể bao gồm, ví dụ, nhưng không chỉ giới hạn ở, tính dung nạp thuốc diệt cỏ, phòng trừ côn trùng, năng suất thay đổi, tính kháng bệnh, tính kháng tác nhân gây bệnh, sự sinh trưởng và sự phát triển của thực vật thay đổi, lượng tinh bột thay đổi, lượng dầu thay đổi, lượng axit béo thay đổi, lượng protein thay đổi, sự chín của quả thay đổi, dinh dưỡng cho người và động vật được tăng cường, sản xuất polyme sinh học, tính kháng áp lực do môi trường, peptit được phẩm, chất lượng xử lý được cải thiện, vị được cải thiện, công dụng sản xuất hạt lai, năng suất sợi được cải thiện, và sản xuất nhiên liệu sinh học mong muốn.

Các ví dụ về gen đáng quan tâm về mặt nông học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm gen về tính kháng cỏ (các patent Mỹ số 6,803,501; 6,448,476; 6,248,876;

6,225,114; 6,107,549; 5,866,775; 5,804,425; 5,633,435; và 5,463,175), năng suất tăng (các patent Mỹ số USRE38,446; 6,716,474; 6,663,906; 6,476,295; 6,441,277; 6,423,828; 6,399,330; 6,372,211; 6,235,971; 6,222,098; và 5,716,837), phòng trừ côn trùng (các patent Mỹ số 6,809,078; 6,713,063; 6,686,452; 6,657,046; 6,645,497; 6,642,030; 6,639,054; 6,620,988; 6,593,293; 6,555,655; 6,538,109; 6,537,756; 6,521,442; 6,501,009; 6,468,523; 6,326,351; 6,313,378; 6,284,949; 6,281,016; 6,248,536; 6,242,241; 6,221,649; 6,177,615; 6,156,573; 6,153,814; 6,110,464; 6,093,695; 6,063,756; 6,063,597; 6,023,013; 5,959,091; 5,942,664; 5,942,658; 5,880,275; 5,763,245; và 5,763,241), tính kháng bệnh nấm (các patent Mỹ số 6,653,280; 6,573,361; 6,506,962; 6,316,407; 6,215,048; 5,516,671; 5,773,696; 6,121,436; 6,316,407; và 6,506,962), tính kháng virus (các patent Mỹ số 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; và 5,304,730), tính kháng giun tròn (patent Mỹ số 6,228,992), tính kháng bệnh vi khuẩn (patent Mỹ số 5,516,671), sự sinh trưởng và sự phát triển của thực vật (các patent Mỹ số 6,723,897 và 6,518,488), sự sản xuất tinh bột (các patent Mỹ số 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), năng suất dầu được cải thiện (các patent Mỹ số 6,444,876; 6,426,447; và 6,380,462), năng suất dầu cao (các patent Mỹ số 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; và 6,476,295), lượng axit béo thay đổi (các patent Mỹ số 6,828,475; 6,822,141; 6,770,465; 6,706,950; 6,660,849; 6,596,538; 6,589,767; 6,537,750; 6,489,461; và 6,459,018), năng suất protein cao (patent Mỹ số 6,380,466), sự chín của quả (patent Mỹ số 5,512,466), dinh dưỡng cho người và động vật được tăng cường (các patent Mỹ số 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; và 6,171,640), polyme sinh học (các patent Mỹ số USRE37,543; 6,228,623; và 5,958,745, và 6,946,588), tính kháng áp lực do môi trường (patent Mỹ số 6,072,103), peptit được phẩm và peptit tiết (các patent Mỹ số 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; và 6,080,560), tính trạng xử lý được cải thiện (patent Mỹ số 6,476,295), khả năng tiêu hóa được cải thiện (patent Mỹ số 6,531,648) rafinoza thấp (patent Mỹ số 6,166,292), sản xuất enzym công nghiệp (patent Mỹ số 5,543,576), vị được cải thiện (patent Mỹ số 6,011,199), sự cố định nitơ (patent Mỹ số 5,229,114), sản xuất hạt lai (patent Mỹ số 5,689,041), sản xuất sợi (các patent Mỹ số 6,576,818; 6,271,443; 5,981,834; và 5,869,720) và sản xuất nhiên liệu sinh học (patent Mỹ số 5,998,700).

Theo cách khác, gen đáng quan tâm về mặt nông học có thể tác động đến các đặc điểm hoặc kiểu hình thực vật nêu trên bằng cách ghi mã phân tử ARN gây ra sự điều biến được hướng đích của sự biểu hiện gen nội sinh, ví dụ, bằng gen đối nghĩa (xem: ví dụ patent Mỹ số 5,107,065); ARN ức chế (“ARNi, bao gồm việc điều biến mức độ biểu hiện gen bằng miARN, siARN, siARN thực hiện, và cơ chế được tạo ra bởi sARN được định pha, ví dụ, như đã được bộc lộ trong các công bố đơn U.S. 2006/0200878 và U.S. 2008/0066206, và trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 11/974,469); hoặc cơ chế được tạo ra bởi sự đồng ức chế. ARN có thể là phân tử ARN xúc tác (ví dụ, ribozym hoặc riboswitch; xem, ví dụ, U.S. 2006/0200878) được thiết kế để tách sản phẩm ARN thông tin nội sinh mong muốn. Các phương pháp có trong lĩnh vực kỹ thuật này để tạo cấu trúc và đưa cấu trúc này vào tế bào theo cách sao cho phân tử ADN có thể phiên mã được phiên mã thành phân tử có khả năng gây ra sự ức chế gen là đã biết.

Gen đánh dấu chọn lọc

Gen chuyển đánh dấu chọn lọc cũng có thể được dùng với yếu tố điều hòa theo sáng chế. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “gen chuyển đánh dấu chọn lọc” chỉ phân tử ADN bất kỳ có thể phiên mã mà sự biểu hiện của nó ở thực vật chuyển gen, mô chuyển gen hoặc tế bào chuyển gen, hoặc sự thiếu chúng, có thể được sàng lọc hoặc được ghi nhận theo một số cách. Gen đánh dấu chọn lọc, và các kỹ thuật chọn lọc và sàng lọc kết hợp của chúng, để dùng trong việc thực hiện sáng chế là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử ADN dễ phiên mã ghi mã β -glucuronidaza (β -glucuronidase - GUS), luxiferaza, protein huỳnh quang màu xanh (green fluorescent protein - GFP), protein tạo ra tính kháng kháng sinh, và protein tạo ra tính dung nạp thuốc diệt cỏ.

Biến nạp tế bào

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất tế bào đã được biến nạp và thực vật đã được biến nạp chứa một hoặc nhiều yếu tố điều hòa liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã.

Thuật ngữ “biến nạp” được dùng để chỉ việc đưa phân tử ADN vào vật chủ nhận. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vật chủ” chỉ vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật, bao gồm tế bào, mô, cơ quan, hoặc thể hệ con bất kỳ của vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật. Mô của thực vật và tế bào thực vật được đặc biệt mong muốn bao gồm thể nguyên sinh, thể chai, rễ, thân củ, hạt, thân cây, lá, cây giống con, phôi, và phần hoa.

Thuật ngữ “được biến nạp” được dùng trong bản mô tả này để chỉ tế bào, mô, cơ quan, hoặc sinh vật mà phân tử ADN lạ, như cấu trúc, được đưa vào trong đó. Phân tử ADN được đưa vào có thể được hợp nhất vào ADN hệ gen của tế bào, mô, cơ quan, hoặc sinh vật nhận sao cho phân tử ADN đã được đưa vào được di truyền cho thế hệ con tiếp theo. Tế bào hoặc sinh vật “chuyển gen” hoặc “được biến nạp” có thể còn bao gồm thế hệ con của tế bào hoặc sinh vật và thế hệ con được tạo ra từ chương trình nhân giống bằng cách sử dụng sinh vật chuyển gen này làm bố mẹ khi lai giống và thể hiện kiểu hình đã được biến đổi được tạo ra nhờ sự có mặt của phân tử ADN lạ. Phân tử ADN được đưa vào còn có thể được đưa nhất thời vào tế bào nhận sao cho phân tử ADN được đưa vào không được di truyền cho thế hệ con tiếp theo. Thuật ngữ “chuyển gen” được dùng để chỉ vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật chứa một hoặc nhiều phân tử ADN khác loài.

Có nhiều phương pháp đã biết đối với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để đưa phân tử ADN vào tế bào của thực vật. Quy trình này thường bao gồm các bước chọn lọc tế bào chủ thích hợp, biến nạp tế bào chủ bằng vật truyền, và thu tế bào chủ đã được biến nạp. Các phương pháp và nguyên liệu để biến nạp tế bào của thực vật bằng cách đưa cấu trúc vào trong hệ gen của thực vật khi thực hiện sáng chế có thể bao gồm phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp đã biết và đã được chứng minh. Các phương pháp thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp gây nhiễm vi khuẩn (ví dụ, *Agrobacterium*), vật truyền BAC hai thành phần, chuyển ADN trực tiếp (ví dụ, bằng cách biến nạp nhờ PEG, hấp thụ ADN nhờ sự làm khô/sự ức chế, xung điện, khuấy trộn với sợi silic carbua, và tăng tốc với hạt phủ ADN), và các phương pháp khác.

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

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

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

Thực vật đã được biến nạp có thể được phân tích về sự có mặt của gen hoặc các gen đáng quan tâm và mức độ và/hoặc tính chất biểu hiện được tạo ra bởi yếu tố điều hòa theo sáng chế. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đã biết nhiều phương pháp có sẵn để phân tích thực vật đã được biến nạp. Ví dụ, các phương pháp phân tích thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, thẩm tách Nam hoặc thẩm tách Bắc, phương pháp dựa trên PCR, phân tích sinh hóa, phương pháp sàng lọc kiểu hình, đánh giá trên đồng ruộng, và thử nghiệm miễn dịch chẩn đoán. Sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã có thể được đo bằng cách sử dụng chất phản ứng TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) và các phương pháp như được hướng dẫn bởi nhà sản xuất và số lần chu trình PCR xác định được bằng cách sử dụng chất nền thử nghiệm TaqMan®. Theo cách khác, chất phản ứng Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) và các phương pháp như được hướng dẫn bởi nhà sản xuất có thể được dùng để đánh giá mức độ chuyển gen.

Sáng chế còn đề xuất các phần của thực vật theo sáng chế. Phần thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lá, thân cây, rễ, thân củ, hạt, nội nhũ, noãn, và phần hoa. Phần thực vật theo sáng chế có thể là sống, không sống, có thể tái sinh, và/hoặc không thể tái sinh. Sáng chế còn bao gồm và đề xuất tế bào của thực vật đã được biến nạp chứa phân tử ADN theo sáng chế. Tế bào của thực vật đã được biến nạp hoặc chuyển gen theo sáng chế bao gồm tế bào của thực vật có thể tái sinh và/hoặc không thể tái sinh.

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm hàng hóa mà được tạo ra từ thực vật chuyển gen hoặc một phần của chúng chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Sản phẩm hàng hóa theo sáng chế chứa lượng phát hiện được của ADN chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự được thể hiện trong SEQ ID NO:1 đến 37. Thuật ngữ “sản phẩm hàng hóa” được dùng trong bản mô tả này để chỉ chế phẩm hoặc sản phẩm bất kỳ mà chứa nguyên liệu thu được từ thực vật, hạt, tế bào của thực vật, hoặc phần thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Sản phẩm hàng hóa bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt đã được xử lý, hạt, phần của thực vật, và bột xay thô. Sản phẩm hàng hóa theo sáng chế sẽ chứa lượng phát hiện được của ADN tương ứng với phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Việc phát hiện một hoặc nhiều ADN này trong

mẫu có thể được sử dụng để xác định lượng hoặc nguồn gốc của sản phẩm hàng hóa. Phương pháp phát hiện tiêu chuẩn bất kỳ đối với phân tử ADN có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp phát hiện được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sáng chế có thể sẽ dễ hiểu hơn khi tham khảo các ví dụ dưới đây, mà được bộc lộ để minh họa, và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế, trừ khi được nêu cụ thể. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ sau thể hiện các kỹ thuật được khám phá bởi các tác giả sáng chế để thực hiện tốt sáng chế. Tuy nhiên, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, dựa vào bản mô tả này, cần phải hiểu rằng có thể tạo ra nhiều thay đổi theo các phương án cụ thể mà được bộc lộ và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không vượt quá ý tưởng và phạm vi của sáng chế, do đó tất cả các đối tượng được nêu hoặc được thể hiện trên các hình vẽ kèm theo cần được hiểu là để minh họa và không có nghĩa là giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Xác định và tách dòng yếu tố điều hòa

Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa (EXP) và vùng kết thúc phiên mã (UTR 3') được xác định và được tách dòng ra khỏi ADN hệ gen của các loài hai lá mầm *Medicago truncatula* (Barrel Medic). Việc chọn lọc UTR 3' của *Medicago truncatula* một phần dựa trên kiểu biểu hiện quan sát được ở gen đậu tương tương đồng.

Việc xác định và tách dòng UTR 3' của *Medicago truncatula* bắt đầu bằng việc chọn lọc gen đậu tương đáng quan tâm dựa trên kiểu biểu hiện của gen đậu tương trong các khảo sát mô đậu tương và thử nghiệm chép hình phiên mã độc quyền. Sau đó, gen đậu tương đã được chọn được sử dụng để tìm ra gen tương đồng ở *Medicago truncatula* bằng cách sử dụng các trình tự ADN có sẵn dùng chung. Tiếp theo, các mẫu mô thu được từ *Medicago truncatula* đã được phân lập ra khỏi thực vật sinh trưởng trong các điều kiện môi trường khác nhau. Sau đó, ARN thông tin (mARN) phân lập được từ mô *Medicago*

và được sử dụng trong thử nghiệm phản ứng chuỗi polymeraza thời thực (PCR) để xác định mô hình biểu hiện của gen *Medicago*. Từ các thử nghiệm này, phân nhóm của hệ gen *Medicagotruncatula* được chọn lọc để tách dòng và xác định đặc điểm.

Bằng cách sử dụng dữ liệu trình tự *Medicago truncatula* dùng chung, phân tích sinh tin được thực hiện để xác định yếu tố điều hòa ở locus gen *Medicago* đã được chọn. Ví dụ, việc phân tích sinh tin được thực hiện để xác định trình tự UTR 3' chứa vùng polyadenyl hóa và vùng kết thúc của ARN thông tin và các trình tự kéo dài ra ngoài đầu của locus gen đã được xác định. Sau đó, các đoạn mồi khuếch đại được thiết kế và sử dụng để khuếch đại mỗi đoạn ADN của yếu tố điều hòa đã được xác định, như đoạn ADN UTR 3', đoạn ADN chứa trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu và intron, và đoạn ADN chứa trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu. Các đoạn ADN thu được được nối vào vật truyền biểu hiện thực vật cơ sở và được xác định trình tự.

Sau đó, đối với các đoạn ADN áp dụng được, phân tích về vị trí bắt đầu phiên mã yếu tố điều hòa (TSS) và mỗi nối intron/exon được thực hiện bằng cách sử dụng thể nguyên sinh thực vật đã được biến nạp. Trong phân tích này, thể nguyên sinh đã được biến nạp bằng vật truyền biểu hiện thực vật chứa đoạn ADN đã được tách dòng liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài. Tiếp theo, hệ RACE 5' để khuếch đại nhanh các đầu ADN bổ trợ, phiên bản 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) được sử dụng để xác nhận TSS yếu tố điều hòa và mỗi tách intron/exon bằng cách phân tích trình tự ADN của sản phẩm phiên mã ARN thông tin đã được tạo ra.

Trình tự ADN của UTR 3' đã được xác định được đưa ra trong bản mô tả này trong SEQ ID NO: 1 đến 30. Ngoài ra, trình tự ADN của trình tự khởi đầu đã được xác định được đưa ra trong bản mô tả này trong SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 36; trình tự ADN của trình tự dẫn đầu đã được xác định được đưa ra trong bản mô tả này dưới dạng SEQ ID NO: 33 và SEQ ID NO: 37; và trình tự ADN của intron đã được xác định được đưa ra trong SEQ ID NO: 34. Ngoài ra, trình tự ADN của EXP đã được xác định được đưa ra trong bản mô tả này trong SEQ ID NO: 31 và 35. Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) chứa yếu tố của trình tự khởi đầu, P-Mt.Ubq2-1:1:1

(SEQ ID NO: 32), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu, L-Mt.Ubq2-1:1:1 (SEQ ID NO: 33), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố intron, I-Mt.Ubq2-1:1:2 (SEQ ID NO: 34) và nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-Mt.AC145767v28:1:1 (SEQ ID NO: 35) chứa yếu tố của trình tự khởi đầu, P-Mt.AC145767v28-1:2:1 (SEQ ID NO: 36), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu, L-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 37). Mỗi trình tự ADN đã được xác định và được tách dòng ra khỏi *Medicago truncatula* được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1. UTR 3', nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa, trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, và intron đã được tách dòng ra khỏi *Medicago truncatula*.

Mô tả	SEQ ID NO:	Chú thích
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	AC145767.28
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	AC140914.20
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	AC139600.16
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	AC153125.10
T-Mt.Apx-1:1:2	5	ascorbat peroxidaza bào tương
T-Mt.EF1a-1:1:2	6	yếu tố kéo dài 1 alpha
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	oxidoreductaza giả định
T-Mt.FBA-1:1:5	8	fructoza biphosphat aldolaza, isozym bào chất 2
T-Mt.FBA-1:2:1	9	fructoza biphosphat aldolaza, isozym bào chất 2
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza
T-Mt.Gpi-1:2:1	11	protein neo trên GPI
T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	protein sốc nhiệt 20
T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	tiền chất protein typ II liên kết với chlorophyl a/b
T-Mt.Lox-1:1:2:1	14	lipxygenaza
T-Mt.Methm-1:2:1	15	5-metyltetrahydropteroyltriglutamat-homoxystein S-metyltransferaza
T-Mt.MP21-1:2:1	16	protein làm nguyên sinh chất của hạt
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	oxidoreductaza giả định
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	protein nguyên sinh chất của màng
T-Mt.Prx-1:1:1	19	peroxidaza
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	protein của hệ thống quang II 5kDa, tiền chất lục lạp
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	protein của hệ thống quang II 5kDa, tiền chất lục lạp
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	chất vận chuyển phosphat
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	chất vận chuyển phosphat
T-Mt.RD22-1:2:1	24	protein chịu trách nhiệm khử nước

Mô tả	SEQ ID NO:	Chú thích
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	protein ribosom L3
T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	protein Sali3-2 sinh ra bởi nhôm
T-Mt.Scp-1:2:1	27	protein liên quan đến serin carboxypeptidaza
T-Mt.SeqID#21-1:2:1	28	peroxidaza
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	yếu tố bắt đầu dịch mã SUI1
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	protein lỗi kẽm kiểu CCCH
EXP-Mt.Ubq2-1:2	31	Ubiquitin 2
P-Mt.Ubq2-1:1:1	32	Ubiquitin 2
L-Mt.Ubq2-1:1:1	33	Ubiquitin 2
I-Mt.Ubq2-1:1:2	34	Ubiquitin 2
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	35	AC145767.28
P-Mt.AC145767v28-1:2:1	36	AC145767.28
L-Mt.AC145767v28-1:1:2	37	AC145767.28

Ví dụ 2

Phân tích tác động của UTR 3' đến mức độ biểu hiện GUS cấu trúc

ở thể nguyên sinh của lá đậu tương

Thế nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền, cụ thể là plasmit cấu trúc, để đánh giá tác động của UTR 3' *Medicago truncatula* được chọn đến sự biểu hiện. Thế nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền ADN chứa trình tự EXP cơ định biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS) liên kết linh hoạt với UTR 3' *Medicago*. Thế nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp UTR 3' *Medicago* được so sánh với thế nguyên sinh của lá đậu tương, trong đó gen chuyển GUS được biểu hiện bằng trình tự khởi đầu cơ định, và gen chuyển GUS liên kết linh hoạt với UTR 3' thu được từ *Gossypium hirsutum* hoặc *Gossypium barbadense*.

Các vật truyền của thực vật được dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được cấu thành bởi vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để chọn lọc tế bào của thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng glyphosat diệt cỏ hoặc spectinomycin kháng sinh (cả hai được tạo ra nhờ trình tự khởi

đầu Actin 7 *Arabidopsis*); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai được dùng để đánh giá hoạt tính của UTR 3', mà chứa trình tự EXP hoặc trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự ADN đối với GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' thu được từ *Medicago truncatula*, *Gossypium hirsutum*, hoặc *Gossypium barbadense*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*. Các vật truyền chứa UTR 3' thu được từ *Medicago* (tức là pMON109593, pMON116803, pMON116812, pMON116813, pMON116815, pMON116826, pMON116827, pMON116830, pMON122852, pMON122853, pMON122854, pMON122855, pMON122856, pMON122857, pMON122858, pMON122859, pMON122862, pMON122864, pMON122865, pMON122866, pMON122867, và pMON122868) sử dụng nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa cấu trúc EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) để khiến cho GUS hoạt động. Các vật truyền chứa vùng dịch mã ở đầu tận cùng 3' thu được từ *Gossypium hirsutum* hoặc *Gossypium barbadense* (tức là pMON81345, pMON81347, và pMON83002) sử dụng trình tự khởi đầu cơ định P-CaMV.35S-enh-1:1:11 (SEQ ID NO: 43) để khiến cho GUS hoạt động.

Bảng 2 đưa ra các cấu trúc plasmit với UTR 3' và SEQ ID NO tương ứng dùng để biến nạp thể nguyên sinh đậu tương trong các thử nghiệm nêu trong Ví dụ này.

Bảng 2. Cấu trúc plasmit dùng để biến nạp thể nguyên sinh của lá đậu tương và mô tả UTR 3'.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:
pMON81345	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON81347	T-Gh.E6-4A-0:2:1	38
pMON83002	T-Gb.H6-1:2:1	39
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13
pMON116813	T-Mt.PSII-T _B -1:2:1	21
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:
pMON116830	T-Mt.Scp-1:2:1	27
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7

Hai vật truyền của thực vật, cụ thể là cấu trúc plasmit, để dùng trong việc đồng biến nạp và chuẩn hóa dữ liệu cũng được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mỗi cấu trúc plasmit này chứa trình tự mã hóa luxiferaza đặc hiệu mà được khiến cho hoạt động bằng EXP cơ định. Vật truyền của thực vật pMON19437 chứa catxet biểu hiện với EXP cơ định chứa trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự dẫn đầu mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với intron (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 47), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa luxiferaza của đom đóm (*Photinus pyralis*) (LUXIFERAZA:1:3, SEQ ID NO: 45), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' từ gen nopalín syntaza *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 49). Vật truyền của thực vật pMON63934 chứa catxet biểu hiện với trình tự EXP cơ định chứa trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự dẫn đầu (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 48), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa luxiferaza của sữa vùng thuộc địa (*Renilla reniformis*) (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 46), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' từ gen nopalín syntaza *Agrobacterium tumefaciens* (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 49).

Thể nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp bằng cách áp dụng phương pháp biến nạp dựa trên polyetylen glycol (PEG), như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mỗi tế bào của thể nguyên sinh được biến nạp với cấu trúc plasmit pMON19437, cấu trúc plasmit pMON63934, và một trong số các cấu trúc plasmit được thể hiện trong Bảng 2. Sau khi biến nạp, thể nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp được ủ qua đêm trong bóng tối hoàn toàn. Tiếp theo, thực hiện phép đo GUS và luxiferaza bằng cách đặt các phần phân ước của chế phẩm tan của tế bào đã được biến nạp vào hai khay có lỗ nhỏ khác nhau. Một khay được sử dụng để đo GUS, và khay thứ hai được dùng để thực hiện thử nghiệm luxiferaza kép bằng cách sử dụng hệ thử nghiệm gen thông báo luxiferaza kép (Promega Corp., Madison, WI; xem tài liệu, ví dụ, *Promega Notes Magazine*, NO: 57, 1996, p.02).

Một hoặc hai biến nạp được thực hiện đối với mỗi cấu trúc plasmit được thể hiện trong Bảng 2. Trị số biểu hiện trung bình đối với mỗi UTR 3' được xác định từ một số mẫu từ mỗi biến nạp. Thực hiện phép đo mẫu bằng cách sử dụng bốn bản sao của mỗi biến nạp cấu trúc plasmit, hoặc theo cách khác, ba bản sao của mỗi cấu trúc plasmit cho mỗi thử nghiệm trong số hai thử nghiệm biến nạp. Mức độ biểu hiện GUS và luxiferaza trung bình được thể hiện trong Bảng 3. Trong Bảng này, trị số luxiferaza của đom đóm (ví dụ, từ sự biểu hiện của pMON19437) được nêu ở cột có tiêu đề "FLuc" và trị số luxiferaza của sứa vùng thuộc địa (ví dụ, từ sự biểu hiện của pMON63934) được nêu ở cột có tiêu đề "RLuc".

Bảng 3. Trị số thử nghiệm GUS và Luxiferaza trung bình ở thể nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS	FLuc	RLuc
pMON81345	T-Gb.FbL2-1:1:1	41	795	2332,5	3701
pMON81347	T-Gh.E6-4A-0:2:1	38	73	584,3	802
pMON83002	T-Gb.H6-1:2:1	39	91	1142,8	1995
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	4783	3619	12341
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	15053	4801,7	15876
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	9771	4202,3	10976

Cấu trúc plasmid	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS	FLuc	RLuc
pMON116813	T-Mt.PSII-T _B -1:2:1	21	7482	3347,3	8395
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	30469	6428	17764
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	22330	3580,5	9984
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	269	343,7	478
pMON116830	T-Mt.Scpi-1:2:1	27	3909	4683,7	10180
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	33403	11049	28226
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	12833	11198	22722
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	14811	8775,5	25229
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	40383	17826	50299
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	21870	16141,3	56362
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	24386	6782,7	15024
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	30753	12929,8	40571
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	14499	5586,7	15222
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	27768	14680	35263
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	40579	15837,7	36515
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	34867	17285,5	52519
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	33664	11923	27663
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	7088	9885,3	19590
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	14539	7563,5	22320

Hơn nữa, để so sánh hoạt tính tương đối của mỗi UTR 3', trị số GUS được biểu thị theo tỷ lệ giữa hoạt tính GUS với hoạt tính luxiferaza và chuẩn hóa thành UTR 3' không phải ở *Medicago* biểu hiện tốt nhất, tức là T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41). Bảng 4 thể hiện tỷ lệ GUS/Luxiferaza và tỷ lệ được chuẩn hóa. Một lần nữa, trong Bảng này, trị số luxiferaza của đom đóm có tiêu đề "FLuc" và trị số luxiferaza của sứa vùng thuộc địa có tiêu đề "RLuc".

Bảng 4. Tỷ lệ GUS/FLuc và tỷ lệ GUS/RLuc của sự biểu hiện được chuẩn hóa đối với T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41) ở thể nguyên sinh của lá đậu tương đã được biến nạp.

Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS/FLuc	GUS/RLuc	GUS/FLuc được chuẩn hóa thành T-Gb.FbL2-1:1:1	GUS/RLuc được chuẩn hóa thành T-Gb.FbL2-1:1:1
T-Gb.FbL2-1:1:1	41	0,34	0,21	1,00	1,00

Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	GUS/FLuc	GUS/RLuc	GUS/FLuc được chuẩn hóa thành T-Gb.FbL2-1:1:1	GUS/RLuc được chuẩn hóa thành T-Gb.FbL2-1:1:1
T-Gh.E6-4A-0:2:1	38	0,12	0,09	0,37	0,42
T-Gb.H6-1:2:1	39	0,08	0,05	0,23	0,21
T-Mt.Pt1 -1:2:2	22	1,32	0,39	3,88	1,80
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	3,13	0,95	9,20	4,41
T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	2,33	0,89	6,82	4,14
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	2,24	0,89	6,56	4,15
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	4,74	1,72	13,91	7,98
T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	6,24	2,24	18,30	10,41
T-Mt.Gpi-1:2:1	11	0,78	0,56	2,30	2,62
T-Mt.Scpl-1:2:1	27	0,83	0,38	2,45	1,79
T-Mt.Methm-1:2:1	15	3,02	1,18	8,87	5,51
T-Mt.Prx-1:1:1	19	1,15	0,56	3,36	2,63
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	1,69	0,59	4,95	2,73
T-Mt.FBA-1:1:5	8	2,27	0,80	6,65	3,74
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	1,35	0,39	3,98	1,81
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	3,60	1,62	10,55	7,56
T-Mt.MP21-1:2:1	16	2,38	0,76	6,98	3,53
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	2,60	0,95	7,61	4,43
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	1,89	0,79	5,55	3,67
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	2,56	1,11	7,52	5,17
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	2,02	0,66	5,92	3,09
T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2,82	1,22	8,28	5,67
T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	0,72	0,36	2,10	1,68
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	1,92	0,65	5,64	3,03

Như đã được thể hiện trong Bảng 4, sự biểu hiện GUS được tăng cường khi sử dụng tất cả các UTR 3' *Medicago* được chọn so với UTR 3' thu được từ *Gossypium hirsutum* hoặc *Gossypium barbadense*. Ví dụ, mức độ biểu hiện của GUS cao hơn từ 2,1 đến 18,3 lần nếu sử dụng UTR 3' thu được từ *Medicago* theo tỷ lệ GUS/FLuc được chuẩn hóa đối với T-Gb.FbL2-1:1:1, UTR 3' biểu hiện tốt nhất của chúng thu được từ *Gossypium hirsutum* hoặc *Gossypium barbadense*. Tương tự, mức độ biểu hiện của GUS

cao hơn từ 1,61 đến 10,48 lần nếu sử dụng UTR 3' thu được từ *Medicago* theo tỷ lệ GUS/RLuc được chuẩn hóa đối với T-Gb.FbL2-1:1:1.

Ví dụ 3

Phân tích tác động của UTR 3' đến sự biểu hiện GUS cấu trúc ở cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền, cụ thể là cấu trúc plasmit, để đánh giá tác động của UTR 3' *Medicago truncatula* được chọn đến sự biểu hiện. Cụ thể là, cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền chứa trình tự EXP cơ định biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS) liên kết linh hoạt với UTR 3' *Medicago*. Các cây đậu tương đã được biến nạp UTR 3' *Medicago* này được so sánh với cây đậu tương đã được biến nạp trong đó gen chuyển GUS được biểu hiện bằng trình tự khởi đầu cơ định, và gen chuyển GUS liên kết linh hoạt với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Các vật truyền của thực vật được dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được chứa vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để chọn lọc tế bào của thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng spectinomycin kháng sinh (được khiến cho hoạt động bằng trình tự khởi đầu Actin 7 *Arabidopsis*); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai được dùng để đánh giá hoạt tính của UTR 3', mà chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' thu được từ *Medicago truncatula* hoặc *Gossypium barbadense*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*. Các vật truyền chứa UTR 3' thu được từ *Medicago* là pMON109593, pMON116803, pMON116812, pMON116813, pMON116815, pMON116826, pMON116827, pMON116830, pMON122850, pMON122851, pMON122852, pMON122853, pMON122854, pMON122855, pMON122856, pMON122857, pMON122858, pMON122859, pMON122861, pMON122862, pMON122863, pMON122864, pMON122865, pMON122866, pMON122867, và

pMON122868. Vật truyền chứa vùng dịch mã ở đầu tận cùng 3' từ *Gossypium barbadense* là pMON102167.

Bảng 5 đưa ra các cấu trúc plasmit với UTR 3' và SEQ ID NO tương ứng dùng để biến nạp cây đậu tương trong các thử nghiệm nêu trong Ví dụ này.

Bảng 5. Cấu trúc plasmit dùng để biến nạp cây đậu tương và mô tả UTR 3'.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13
pMON116813	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng cách áp dụng các phương pháp biến nạp thông qua *Agrobacterium* đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sự biểu hiện của GUS được thử nghiệm theo cách định tính bằng cách sử dụng các phần mô của mô đã được chọn. Để phân tích hóa mô của GUS, các phần mô nguyên vẹn được ủ với dung dịch nhuộm màu GUS X-Gluc (5-bromo-4-clo-3-indolyl-b-glucuronit) (1 mg/ml) trong khoảng thời gian thích hợp, được rửa, và quan sát bằng mắt về sự chuyển màu thành màu xanh nước biển. Hoạt tính GUS được xác định theo cách định tính bằng cách quan sát trực tiếp bằng mắt hoặc quan sát qua kính hiển vi bằng cách sử dụng các bộ phận và mô của thực vật đã được chọn. Thực vật thể hệ R₀ được quan sát về sự biểu hiện ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, Hoa R1, Phôi vỏ màu vàng (khoảng giai đoạn phát triển R8), Lá mầm vỏ màu vàng (khoảng giai đoạn phát triển R8), Hạt chưa chín R3, Vỏ R3, và Lá mầm R5.

Sự thay đổi định lượng của sự biểu hiện GUS so với sự biểu hiện được truyền bởi pMON102167, mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*, cũng được phân tích, như được thể hiện trong các bảng 6 đến 13. Đối với phân tích định lượng này, tổng protein đã được chiết từ mô đã được chọn của thực vật đã được biến nạp. Một microgam tổng protein được dùng với cơ chất sinh huỳnh quang 4-metyleumbelliferyl- β -D-glucuronit (MUG) trong tổng thể tích hỗn hợp phản ứng là 50 μ l. Sản phẩm phản ứng, 4-methlyumbeliferon (4-MU), phát huỳnh quang mạnh nhất ở độ pH cao, khi nhóm hydroxyl được ion hóa. Việc bổ sung dung dịch kiềm chứa natri cacbonat đồng thời dùng thử nghiệm này và điều chỉnh độ pH để định lượng sản phẩm huỳnh quang. Mức phát huỳnh quang được đo bằng kích thích ở bước sóng 365nm, phát xạ ở bước sóng 445nm bằng cách sử dụng Fluoromax-3 (Horiba; Kyoto, Nhật Bản) với thiết bị Micromax Reader, với chiều rộng khe hở được thiết lập ở bước sóng kích thích 2nm, phát xạ 3nm.

Bảng 6 và bảng 7 thể hiện mức độ biểu hiện định lượng trung bình đo được ở mô của thực vật thể hệ R₀. Các mô không được thử nghiệm được thể hiện dưới dạng các ô trống trong cả hai bảng.

Bảng 6. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở thực vật thể hệ R₀ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, và Hoa R1.

Cấu trúc plasmid	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	400,90	551,61	605,29	350,93		412,30
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	740,77	654,50	946,25	579,76	342,11	215,37
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	1306,76	2269,95	2187,61	344,78	480,47	243,11
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	649,15	785,16	1103,30	644,76	297,30	294,38
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	382,80	891,91	1026,78	262,82	253,94	179,31
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	3817,28	1939,40	3250,38	1393,65	1001,37	876,08
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	1093,15	1626,41	2030,11	3315,25	1376,39	1980,93
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	839,31	1263,82	1172,16	617,58	457,17	235,01
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	240,31	187,07	330,49	113,50	20,79	41,73
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	479,50	673,20	687,00	388,10	524,10	202,68
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	897,98	287,52	667,63	325,50	1056,16	407,35
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	852,05	1003,70	456,38	883,30	560,70	184,02
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	858,88	591,51	362,40	841,82	459,48	220,29
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	957,90	910,53	343,90	583,62	570,15	198,11
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	1293,27	396,14	338,26	167,55	113,14	94,21
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	254,48	250,56	154,27	425,90	223,53	115,33
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	1035,43	1014,18	579,85	1631,94	921,34	421,81
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	408,94	299,07	282,34	315,48	562,46	308,11
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3228,98	1315,58	2092,77	849,69	406,58	98,10
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	974,70	433,60	510,50	263,00	103,70	117,70
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	1131,24	710,62	604,88	342,22	182,58	219,67
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	667,00	281,00	398,30	171,40	323,10	281,30
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	448,00	203,00	240,00	401,00	369,00	355,00
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	385,42	160,51	298,16	239,01	104,64	32,62

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuồng lá R1	Hoa R1
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2274,70	1176,10	1490,54	976,91	753,02	45,26
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	753,94	544,73	395,30	675,68	668,83	255,68
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	1151,60	608,21	692,82	235,62	87,40	157,45

Bảng 7. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở thực vật thể hệ R₀ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3, và Lá mầm R5.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	18,56	170,11	28,63	406,13	71,91
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	100,42	181,62	209,92	467,72	190,51
pMON116812	T-Mt.Lhecb2-1:2:1	13	74,53	120,30	163,76	526,08	407,40
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	127,65	279,84	78,12	282,34	50,92
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	358,03	1192,69	989,47	2309,72	566,93
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	280,48	577,87	231,15	2868,17	341,60
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	118,18	127,74	10,96	37,22	27,80
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	57,11	72,33	23,96	271,88	98,36
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	265,30	489,70	57,40	487,50	264,40
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	95,88	189,41	121,12	1045,20	72,23
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	153,46	320,64	53,24	686,92	518,51
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	46,64	146,53	38,64	360,48	103,28
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	165,11	160,40	66,44	464,75	245,85
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	172,21	381,32	111,57	496,04	306,13
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	46,37	44,66	87,51	775,69	57,17
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	142,78	243,74	45,58	615,99	452,09
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	102,11	260,98	137,76	667,18	169,16

Cấu trúc plasmid	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	192,92	539,13	74,44	950,85	43,69
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	53,50	217,70	37,90	95,30	174,50
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	195,81	502,37	62,10	135,60	500,71
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	136,80	270,20	127,20	387,10	150,00
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	140,00	220,00	87,00	398,00	102,00
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	20,55	56,64			11,83
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	126,53	334,27			59,33
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	136,36	242,52	77,11	509,01	73,23
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	201,21	186,14	208,37	1264,62	203,90

Như đã được thể hiện trong bảng 6 và bảng 7, sự biểu hiện gây ra bởi cùng một EXP khác biệt ở các mô của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định chứa UTR 3' *Medicago* khác so với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Bảng 8 và bảng 9 thể hiện số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở các mô của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định chứa UTR 3' *Medicago* khác so với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Bảng 8. Số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₀ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, và Hoa R1.

Cấu trúc plasmid	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Hoa R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	1,85	1,19	1,56	1,65	0,52
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	3,26	4,12	3,61	0,98	0,59
pMON116812	T-Mt.Lhcb2-1:2:1	13	1,62	1,42	1,82	1,84	0,71
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	0,95	1,62	1,70	0,75	0,43
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	9,52	3,52	5,37	3,97	2,12
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	2,73	2,95	3,35	9,45	4,80
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	2,09	2,29	1,94	1,76	0,57
pMON116830	T-Mt.Scpl-1:2:1	27	0,60	0,34	0,55	0,32	0,10
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	1,20	1,22	1,14	1,11	0,49
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	2,24	0,52	1,10	0,93	0,99
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	2,13	1,82	0,75	2,52	0,45
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	2,14	1,07	0,60	2,40	0,53
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	2,39	1,65	0,57	1,66	0,48
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	3,23	0,72	0,56	0,48	0,23
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	0,63	0,45	0,25	1,21	0,28
pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	2,58	1,84	0,96	4,65	1,02
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	1,02	0,54	0,47	0,90	0,75
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	8,05	2,39	3,46	2,42	0,24
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	2,43	0,79	0,84	0,75	0,29
pMON122862	T-Mt.Suil-1:1:2	29	2,82	1,29	1,00	0,98	0,53
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	1,66	0,51	0,66	0,49	0,68

pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	1,12	0,37	0,40	1,14	0,86
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	0,96	0,29	0,49	0,68	0,08
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	5,67	2,13	2,46	2,78	0,11
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	1,88	0,99	0,65	1,93	0,62
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	2,87	1,10	1,14	0,67	0,38

Bảng 9. Số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thế hệ R₀ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3, và Lá mầm R5.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON109593	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	0,39	3,44	0,42	0,94	0,71
pMON116803	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	2,10	3,67	3,11	1,08	1,88
pMON116812	T-Mt.Lheb2-1:2:1	13	1,56	2,43	2,43	1,21	4,02
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	2,67	5,66	1,16	0,65	0,50
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	7,48	24,12	14,67	5,33	5,59
pMON116826	T-Mt.Lox-1-1:2:1	14	5,86	11,69	3,43	6,62	3,37
pMON116827	T-Mt.Gpi-1:2:1	11	2,47	2,58	0,16	0,09	0,27
pMON116830	T-Mt.Scop-1:2:1	27	1,19	1,46	0,36	0,63	0,97
pMON122850	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	5,54	9,90	0,85	1,12	2,61
pMON122851	T-Mt.RD22-1:2:1	24	2,00	3,83	1,80	2,41	0,71
pMON122852	T-Mt.Methm-1:2:1	15	3,21	6,48	0,79	1,58	5,12
pMON122853	T-Mt.Prx-1:1:1	19	0,97	2,96	0,57	0,83	1,02
pMON122854	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	3,45	3,24	0,99	1,07	2,43
pMON122855	T-Mt.FBA-1:1:5	8	3,60	7,71	1,65	1,14	3,02
pMON122856	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	0,97	0,90	1,30	1,79	0,56

pMON122857	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	2,98	4,93	0,68	1,42	4,46
pMON122858	T-Mt.MP21-1:2:1	16	2,13	5,28	2,04	1,54	1,67
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	4,03	10,90	1,10	2,19	0,43
pMON122861	T-Mt.Apx-1:1:2	5	1,12	4,40	0,56	0,22	1,72
pMON122862	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	4,09	10,16	0,92	0,31	4,94
pMON122863	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	2,86	5,46	1,89	0,89	1,48
pMON122864	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	2,93	4,45	1,29	0,92	1,01
pMON122865	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	0,43	1,15			0,12
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	2,64	6,76			0,59
pMON122867	T-Mt.Hsp20-1:2:1	12	2,85	4,90	1,14	1,17	0,72
pMON122868	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	4,20	3,76	3,09	2,92	2,01

Như đã được thể hiện trong bảng 8 và bảng 9, mức độ biểu hiện ở mô của cây đậu tương đã được biến nạp chứa UTR 3' *Medicago* khác khác biệt so với mức độ biểu hiện ở mô của cây đậu tương đã được biến nạp bằng pMON102167, mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*. Ví dụ, hai UTR 3' *Medicago*, T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) và T-Mt.Lox-1-1:2:1 (SEQ ID NO: 14) tạo ra mức độ biểu hiện gia tăng của EXP cơ định, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), ở tất cả các mô. UTR 3' *Medicago* khác tạo ra mức độ biểu hiện gia tăng của EXP cơ định ở một số mô, trong khi làm giảm mức độ biểu hiện ở các mô khác. Ví dụ, UTR 3' T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO: 26) tạo ra mức tăng 2,19 lần đến 8,05 lần về mức độ biểu hiện ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Phôi vỏ màu vàng, và Lá mầm vỏ màu vàng, trong khi làm giảm mức độ biểu hiện ở Hoa R1 và Lá mầm R5. Hơn nữa, UTR 3' T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (SEQ ID NO: 2) tạo ra mức tăng 1,88 lần đến 4,12 lần mức độ biểu hiện ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, và Lá mầm R5, trong khi làm giảm mức độ biểu hiện ở Lá nguồn R1, Hoa R1, và duy trì mức độ biểu hiện tương đối giống như ở Vỏ R3. Ngoài ra, UTR 3' T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) tạo ra mức tăng 2,19 lần đến 10,90 lần mức độ biểu hiện ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, và Vỏ R3, trong khi làm giảm mức độ biểu hiện ở Hoa R1 và Lá mầm R5, và duy trì mức độ biểu hiện tương đối giống như ở Hạt chưa chín R3.

Một số cây đậu tương đã được biến nạp chứa UTR 3' *Medicago* khác được đưa vào thể hệ R₁. Bảng 10 và bảng 11 thể hiện các trị số biểu hiện GUS trung bình của các mô đã được thử nghiệm. Bảng 12 và bảng 13 thể hiện số lần khác biệt về mức độ biểu hiện so với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Bảng 10. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, và Hoa R1.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	934,22	992,31	1210,30	856,01	570,64	603,61
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	1462,92	1169,79	1495,65	1159,28	647,86	506,70
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	5555,77	5146,48	4447,42	2654,13	2825,41	2584,82
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3726,08	3090,41	3862,55	2666,68	1160,66	1041,40
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	3438,35	2856,04	2510,49	2012,63	1087,69	919,57

Bảng 11. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3 và Lá mầm R5.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	85,27	174,11	298,03	567,48	85,11
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	468,66	537,77	171,00	976,84	342,29
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	1314,44	2134,97	1039,30	4506,45	1842,61
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	730,81	1098,62	245,45	1947,45	423,40
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	686,08	988,27	488,62	1068,10	757,12

Như đã được thể hiện trong bảng 10 và bảng 11, mức độ biểu hiện được tạo ra bởi cùng một EXP khác biệt ở các mô của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định chứa UTR 3' *Medicago* khác so với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*. Bảng 12 và bảng 13 thể hiện số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở mô của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định chứa UTR 3' *Medicago* khác so với mô đã được biến nạp bằng pMON102167, mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Bảng 12. Số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R₁, Cuống lá R₁, và R₁.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3’	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R ₁	Cuống lá R ₁	Hoa R ₁
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	1,57	1,18	1,24	1,35	1,14	0,84
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	5,95	5,19	3,67	3,10	4,95	4,28
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	3,99	3,11	3,19	3,12	2,03	1,73
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	3,68	2,88	2,07	2,35	1,91	1,52

Bảng 13. Số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3 và Lá mầm R5.

Plasmid Cấu trúc	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
pMON102167	T-Gb.E6-3b:1:1	40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
pMON116813	T-Mt.PSII-T B-1:2:1	21	5,50	3,09	0,57	1,72	4,02
pMON116815	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	15,42	12,26	3,49	7,94	21,65
pMON122859	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	8,57	6,31	0,82	3,43	4,97
pMON122866	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26	8,05	5,68	1,64	1,88	8,90

Như đã được thể hiện trong các bảng 12 và 13, một vài UTR 3' *Medicago* làm gia tăng mức độ biểu hiện của yếu tố EXP cơ định, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), so với thực vật đã được biến nạp bằng pMON102167, mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense* ở thể hệ R₁. Ví dụ, UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) tạo ra mức gia tăng 3,10 lần đến 21,65 lần về mức độ biểu hiện GUS ở tất cả các mô đã được thử nghiệm. UTR 3' T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO: 26) tạo ra mức gia tăng 1,52 lần đến 8,90 lần về mức độ biểu hiện GUS ở tất cả các mô đã được thử nghiệm. UTR 3' T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) tạo ra mức gia tăng ở hầu hết các mô, nhưng làm giảm mức độ biểu hiện ở Hạt chưa chín R3 so với thực vật đã được biến nạp bằng T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40).

Các thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng các yếu tố UTR 3' thu được từ *Medicago truncatula* ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của yếu tố EXP cơ định EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) theo nhiều cách tùy theo UTR 3' cụ thể được chọn. Trong nhiều trường hợp, có sự gia tăng của mức độ biểu hiện ở các mô nhất định của thực vật đã được biến nạp bằng vật truyền biểu hiện thực vật chứa UTR 3' *Medicago* so với thực vật đã được biến nạp bằng pMON102167, mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*. Tuy nhiên, không thấy có tác dụng tăng cường ở tất cả các mô của thực vật và, trong nhiều trường hợp, sự biểu hiện bị làm cho yếu đi ở một số mô và được tăng cường ở các mô khác khi sử dụng UTR 3' *Medicago*. Do đó, việc sử dụng UTR 3' *Medicago* được chọn cho phép “tinh chỉnh” tính chất biểu hiện của gen chuyển

cụ thể và có thể được sử dụng kết hợp với các yếu tố biểu hiện khác, như trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu và intron, trong liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã để tạo ra sự biểu hiện tối ưu ở các mô cụ thể, trong khi làm giảm mức độ biểu hiện ở các mô ít mong muốn hơn đối với phân tử ADN có thể phiên mã cụ thể.

Ví dụ 4

Phân tích tác động của UTR 3' đến sự biểu hiện GUS được ưu tiên ở hạt của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền, cụ thể là cấu trúc plasmit, để đánh giá tác động của UTR 3' *Medicago* được chọn đến sự biểu hiện. Cụ thể, cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền ADN chứa trình tự EXP biểu hiện ở hạt gây ra sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS) liên kết linh hoạt với UTR 3' *Medicago*. Các cây đậu tương đã được biến nạp UTR 3' *Medicago* này được so sánh với cây đậu tương đã được biến nạp, trong đó gen chuyển GUS được biểu hiện bằng trình tự EXP biểu hiện ở hạt và gen chuyển GUS liên kết linh hoạt với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Các vật truyền của thực vật mà được dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được chứa vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để chọn lọc tế bào của thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng spectinomycin kháng sinh (được khiến cho hoạt động bằng trình tự khởi đầu Actin 7 *Arabidopsis*); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai được dùng để đánh giá hoạt tính của UTR 3', mà chứa yếu tố EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO: 50), mà tạo ra sự biểu hiện được ưu tiên ở hạt, liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' thu được từ *Medicago truncatula* hoặc *Gossypium barbadense*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*. Vật truyền biểu hiện thực vật chứa UTR 3' thu được từ *Medicago* là pMON116832, pMON116834, pMON116835, pMON116841, pMON122869, pMON122870, pMON122871, pMON122872, pMON122873,

pMON122874, pMON122875, pMON122876, pMON122878, pMON122879, pMON122880, pMON122881, pMON122882, pMON122883, pMON122885, pMON122887, pMON122888, và pMON126122. Vật truyền này chứa UTR 3' từ *Gossypium barbadense* là pMON83028.

Bảng 14 đưa ra cấu trúc plasmit với UTR 3', SEQ ID NO, và thể hệ tương ứng mà đã được tạo dữ liệu thử nghiệm định lượng.

Bảng 14. Cấu trúc plasmit dùng để biến nạp cây đậu tương và UTR 3' tương ứng.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Thể hệ mà dữ liệu được tạo ra cho nó
pMON83028	T-Gb.E6-3b:1:1	40	R ₁
pMON116832	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	R ₀
pMON116834	T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	R ₀
pMON116835	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	R ₀
pMON116841	T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	R ₀
pMON122869	T-Mt.RpL3-1:2:1	25	R ₀
pMON122870	T-Mt.RD22-1:2:1	24	R ₀
pMON122871	T-Mt.Methm-1:2:1	15	R ₀
pMON122872	T-Mt.Prx-1:1:1	19	R ₀
pMON122873	T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	R ₀
pMON122874	T-Mt.FBA-1:2:1	9	R ₀
pMON122875	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	R ₀ và R ₁
pMON122876	T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	R ₀
pMON122878	T-Mt.Oxr-1:2:1	17	R ₀
pMON122879	T-Mt.Apx-1:1:2	5	R ₀ và R ₁
pMON122880	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	R ₀ và R ₁
pMON122881	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	R ₀ và R ₁
pMON122882	T-Mt.Pip1-1:2:1	18	R ₀
pMON122883	T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	R ₀
pMON122885	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	R ₀
pMON122887	T-Mt.Pt1-1:2:2	22	R ₀
pMON122888	T-Mt.Pt2-1:2:2	23	R ₀
pMON126122	T-Mt.Expr1-1:2:1	7	R ₀

Cây đậu tương đã được biến nạp và GUS được thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3. Các bảng 15 và 16 đưa ra trị số GUS trung bình định lượng đối với thể hệ R₀ của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định.

Bảng 15. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở thế hệ R₀ của cây đậu tương đã được biến nạp ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3, và Lá mầm R5.

Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	572	1045	9	6	8
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	210	371	7	6	61
T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1	1445	4264	11	8	47
T-Mt.PSII-T_B-1:2:1	21	218	774	15	16	60
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	683	1087			
T-Mt.RD22-1:2:1	24	3164	6809	30	15	24
T-Mt.Methm-1:2:1	15	459	2136	7	6	74
T-Mt.Prx-1:1:1	19	109	794	9	6	42
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	241	745	6	5	
T-Mt.FBA-1:2:1	9	622	772	10	6	100
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	192	193	2	2	31
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	319	2150	8	6	157
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	995	3220	5	4	235
T-Mt.Apx-1:1:2	5	41	272	10	9	10
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	120	546	15	116	16
T-Mt.EF1a-1:1:2	6			10	9	17
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	670	614	8	9	5
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	2079	4192	8	6	62
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	385	1092	11	5	299
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	142	630	14	14	426
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	440	513	2	1	10
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	527	1122	15	6	154

Bảng 16. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thế hệ R₀ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, và Hoa R1.

Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2	23	4	6	4	4	4
T-Mt.PSII-T_A-1:2:1	20	29	5	8	6	3	3
T-Mt.AC145767v28-	1	10	3	4	0	0	0

Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
1:1:2							
T-Mt.PSII-T _B -1:2:1	21	8	5	5	5	5	6
T-Mt.RpL3-1:2:1	25	60	26	22	7	8	9
T-Mt.RD22-1:2:1	24	21	2	3	12	11	11
T-Mt.Methm-1:2:1	15	8	4	4	0	0	0
T-Mt.Prx-1:1:1	19	5	5	5	0	0	0
T-Mt.Gapdh-1:2:1	10	20	8	6	8	6	8
T-Mt.FBA-1:2:1	9	9	3	3	18	15	17
T-Mt.Zfp-1:2:1	30	41	13	14	7	5	6
T-Mt.AC139600v16-1:2:1	3	7	5	5	0	0	0
T-Mt.Oxr-1:2:1	17	7	3	8	0	0	0
T-Mt.Apx-1:1:2	5	31	16	19	1173	294	357
T-Mt.Sui1-1:1:2	29	29	20	19	10	5	4
T-Mt.EF1a-1:1:2	6	8	3	3	16	19	19
T-Mt.Pip1-1:2:1	18	15	7	6	8	4	3
T-Mt.AC153125V10-1:2:1	4	16	5	3	0	0	0
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	22	8	10	6	3	3
T-Mt.Pt1-1:2:2	22	8	6	5	5	6	6
T-Mt.Pt2-1:2:2	23	34	11	11	6	6	6
T-Mt.Expr1-1:2:1	7	15	6	8	5	4	4

Như có thể thấy được trong bảng 15 và bảng 16, hầu hết UTR 3' *Medicago* ảnh hưởng đến sự biểu hiện của yếu tố EXP được ưu tiên của hạt, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO: 50), chỉ ở mô có nguồn gốc từ hạt, ngoại trừ T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID NO: 5), mà làm gia tăng mức độ biểu hiện của GUS ở lá nguồn R1, Cuống lá R1, và Hoa R1. Một vài UTR 3' *Medicago* tạo ra mức độ biểu hiện cao ở Phôi vỏ màu vàng và Lá mầm vỏ màu vàng, như T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1), T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID NO: 24), và T-Mt.AC153125V10-1:2:1 (SEQ ID NO: 4). Do đó, các UTR 3' này có thể là lý tưởng để làm gia tăng mức độ biểu hiện của trình tự khởi đầu ở hạt trong các giai đoạn phát triển muộn hơn của hạt. UTR 3' T-Mt.Expr1-1:2:1 (SEQ ID NO: 7) tạo ra mức độ biểu hiện cao ở cả Lá mầm R5 và Lá mầm vỏ màu vàng so với nhiều UTR 3' khác, và do đó có thể là hữu dụng trong việc tạo ra mức độ biểu hiện cao ở lá mầm cho khoảng

phát triển hạt rộng hơn. Trong một số trường hợp, UTR 3' tạo ra mức độ biểu hiện hạt đồng đều hơn ở cả Phôi vỏ màu vàng và Lá mầm vỏ màu vàng, như khi sử dụng T-Mt.FBA-1:2:1 (SEQ ID NO: 9), T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID NO: 30), T-Mt.Pip1-1:2:1 (SEQ ID NO: 18), và T-Mt.Pt2-1:2:2 (SEQ ID NO: 23).

Thực vật thể hệ R₀ chứa T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID NO: 30), T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID NO: 5), T-Mt.Sui1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29), và T-Mt.EF1a-1:1:2 (SEQ ID NO: 6) được cho phép tạo hạt và được trồng để nghiên cứu thể hệ R₁. Bảng 17 thể hiện sự so sánh của dữ liệu thử nghiệm định lượng trung bình đối với các gen của thực vật thể hệ R₁ chứa UTR 3' *Medicago* và thực vật đã được biến nạp bằng pMON83028, mà chứa UTR 3' T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) thu được từ *Gossypium barbadense*.

Bảng 17. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, và Lá mầm R5.

Cấu trúc plasmit	Mô tả UTR 3'	SEQ ID NO:	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Lá mầm R5
pMON83028	T-Gb.E6-3b:1:1	40	102	362	7
pMON122875	T-Mt.Zfp-1:2:1	30	56	153	498
pMON122879	T-Mt.Apx-1:1:2	5	205	645	777
pMON122880	T-Mt.Sui1-1:1:2	29	462	1241	355
pMON122881	T-Mt.EF1a-1:1:2	6	415	1059	11

Như có thể thấy được trong Bảng 17, UTR 3' *Medicago* ảnh hưởng đến sự biểu hiện khác biệt so với T-Gb.E6-3b:1:1 ở mô phôi và mô lá mầm. Ví dụ, T-Mt.Apx-1:1:2 (SEQ ID NO: 5) và T-Mt.Sui1-1:1:2 (SEQ ID NO: 29) làm gia tăng của mức độ biểu hiện yếu tố EXP được ưu tiên của hạt ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, và Lá mầm R5 so với T-Gb.E6-3b:1:1. T-Mt.EF1a-1:1:2 (SEQ ID NO: 6) làm gia tăng mức độ biểu hiện ở Phôi vỏ màu vàng và Lá mầm vỏ màu vàng, nhưng không làm gia tăng sự biểu hiện ở Lá mầm R5. T-Mt.Zfp-1:2:1 (SEQ ID NO: 30) làm giảm mức độ biểu hiện ở Phôi vỏ màu vàng và Lá mầm vỏ màu vàng phát triển muộn hơn, nhưng gia tăng mức độ biểu hiện ở Lá mầm R5.

Do đó, mỗi UTR 3' *Medicago* khác nhau ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện khác nhau ở hạt phát triển khi ở trong liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu được ưu tiên của hạt. Các khác biệt về sự ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện này có thể được dùng để tạo ra nghiên cứu chính xác và tùy chỉnh hơn đối với sự biểu hiện hạt và có thể phù hợp một cách lý tưởng để “tinh chỉnh” tính chất biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã cụ thể khi muốn có sự biểu hiện hạt.

Ví dụ 5

Phân tích tác động của UTR 3' đến mức độ biểu hiện GUS cấu trúc ở cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền, cụ thể là cấu trúc plasmid, để đánh giá tác động của UTR 3' *Medicago truncatula* được chọn đến mức độ biểu hiện. Cụ thể, cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền chứa hai yếu tố EXP khác nhau mà thể hiện tính chất biểu hiện cấu trúc biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS) liên kết linh hoạt với UTR 3' *Medicago*. Các thực vật đã được biến nạp UTR 3' *Medicago* này được so sánh với cây đậu tương đã được biến nạp, trong đó sự biểu hiện của gen chuyển GUS liên kết linh hoạt với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Các vật truyền của thực vật dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được chứa vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để chọn lọc tế bào của thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng spectinomycin kháng sinh (được khiến cho hoạt động bằng trình tự khởi đầu Actin 7 *Arabidopsis*); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai được dùng để đánh giá hoạt tính của UTR 3', mà chứa các yếu tố EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42) hoặc EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 51) liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), mà liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' thu được từ *Medicago truncatula* hoặc *Gossypium barbadense*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*. Các vật truyền chứa UTR 3' thu được

từ *Medicago* là pMON118768, pMON153701 và pMON116803. Các vật truyền chứa UTR 3' từ *Gossypium barbadense* là pMON121042 và pMON102167.

Bảng 18 đưa ra cấu trúc plasmit với yếu tố EXP, UTR 3' và SEQ ID NO tương ứng được dùng để biến nạp cây đậu tương nêu trong Ví dụ này.

Bảng 18. Cấu trúc plasmit được dùng để biến nạp cây đậu tương và yếu tố EXP và UTR 3' tương ứng.

Cấu trúc plasmit	Mô tả EXP	EXP SEQ ID NO:	Mô tả UTR 3'	UTR 3' SEQ ID NO:
pMON121042	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118768	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON153701	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2
pMON102167	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON122866	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	26
pMON116803	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2

Thực vật đã được biến nạp và GUS được thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3. Bảng 19 và bảng 20 đưa ra trị số GUS trung bình định lượng đối với thể hệ R_0 của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định.

Bảng 19. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₀ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá mầm R1, Cuống lá R1, và Hoa R1.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	780,79	688,93	509,35	320,02	379,69	467,94
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	4782,43	1009,59	1208,48	363,55	1425,76	1398,80
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	3792,66	725,38	1106,9	1831,99	4792,28	739,97
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	400,90	551,61	605,29	350,93		412,30
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	2274,70	1176,10	1490,54	976,91	753,02	45,26
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	1306,76	2269,95	2187,61	344,78	480,47	243,11

Bảng 20. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₀ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3 và Lá mầm R5.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	104,58	115,16	340,02	859,14	64,18
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	1582,51	832,99	84,88	1157,18	247,75
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	961,14	1050,82	456,55	2455,53	861,1
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	126,53	334,27			59,33
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	100,42	181,62	209,92	467,72	190,51

Như đã được thể hiện trong bảng 19 và bảng 20, UTR 3' *Medicago* T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO: 26) và T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (SEQ ID NO: 2) ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của yếu tố EXP cơ định EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 51) khác biệt so với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense* T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40). Ở nhiều mô được lấy mẫu, có sự gia tăng của mức độ biểu hiện khi sử dụng UTR 3' *Medicago*. Đối với UTR 3' T-Mt.AC140914v20-1:2:1, quan sát thấy sự gia tăng ở hầu hết các mô của thực vật còn chứa yếu tố EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42). Bảng 21 và bảng 22 thể hiện số lần khác biệt của mức độ biểu hiện GUS định lượng so với mức độ biểu hiện được truyền bởi pMON121042 (T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40)), mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Bảng 21. Số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1 và Hoa R1.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	6,13	1,47	2,37	1,14	3,76	2,99
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	4,86	1,05	2,17	5,72	12,62	1,58
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	5,67	2,13	2,46	2,78		0,11
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	3,26	4,12	3,61	0,98		0,59

Bảng 22. Số lần khác biệt về mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3 và Lá mầm R5.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	15,13	7,23	0,25	1,35	3,86
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	9,19	9,13	1,34	2,86	13,42
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	2,64	6,76			0,59
EXP-CaMV.35S- enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC140914v20-1:2:1	2,10	3,67	3,11	1,08	1,88

Các thử nghiệm nêu trên cho thấy rằng mỗi UTR 3' *Medicago* có ảnh hưởng khác nhau đến mức độ biểu hiện của mỗi yếu tố EXP cơ định so với pMON121042 (T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40)), mà chứa UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*. Ví dụ, mức độ biểu hiện của EXP-DaMV.FLT:1:2 gia tăng 1,14 lần đến 15,13 lần ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, Hoa R1, Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Vỏ R3, và Lá mầm R5, nhưng giảm ở Hạt chưa chín R3 khi sử dụng T-Mt.Sali3-2-1:2:1. Cùng một yếu tố EXP này, khi kết hợp với T-Mt.AC140914v20-1:2:1, dẫn đến mức gia tăng 1,34 lần đến 13,42 lần ở Rễ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1, Hoa R1, Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3, và Lá mầm R5, nhưng vẫn gần giống như T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) ở Lá dự trữ V5. Mức độ biểu hiện ở Phôi vỏ màu vàng bằng khoảng hai lần sự biểu hiện ở Lá mầm vỏ màu vàng khi sử dụng T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (mức gia tăng 15,13 lần so với 7,23 lần), trong khi mức độ biểu hiện ở hai mô này tương đối giống như khi sử dụng T-Mt.AC140914v20-1:2:1 (mức gia tăng 9,19 lần so với 9,13 lần). Liên quan đến yếu tố EXP EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3, sự kết hợp với T-Mt.AC140914v20-1:2:1 tạo ra mức gia tăng nhỏ hơn ở nhiều mô được lấy mẫu so với khi cùng UTR 3' này được kết hợp với EXP-DaMV.FLT:1:2. Ở Hoa R1, có sự giảm mức độ biểu hiện so với T-Gb.E6-3b:1:1 khi EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 được kết hợp với T-Mt.AC140914v20-1:2:1. Sự kết hợp của EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 với T-Mt.Sali3-2-1:2:1 tạo ra sự gia tăng mức độ biểu hiện ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Phôi vỏ màu vàng, và Lá mầm vỏ màu vàng, nhưng làm giảm mức độ biểu hiện ở Hoa R1 và Lá mầm R5 so với T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40).

Một trong số hai UTR 3' *Medicago*, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 và T-Mt.AC140914v20-1:2:1, ảnh hưởng một cách khác biệt đến sự biểu hiện của hai yếu tố EXP cơ định khác nhau, EXP-DaMV.FLT:1:2 và EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3. Ở nhiều mô, có sự gia tăng mức độ biểu hiện so với T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40), nhưng ở một số mô, xảy ra sự giảm mức độ biểu hiện. Do đó, bằng cách sử dụng UTR 3' *Medicago* khác, có

khả năng kiểm soát chính xác hơn mức độ biểu hiện ở thực vật và “tinh chỉnh” tốt hơn mức độ biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã cụ thể để tạo ra sự biểu hiện tối ưu khi sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã là điều cần thiết, trong khi làm giảm mức độ biểu hiện ở các mô mà ảnh hưởng bất lợi đến thực vật.

Ví dụ 6

UTR 3' *Medicago truncatula* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 gây ra sự gia tăng mức độ biểu hiện GUS khi kết hợp với nhiều yếu tố EXP khác nhau ở cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền, cụ thể là cấu trúc plasmit, để đánh giá tác động của UTR 3' *Medicago* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) đến mức độ biểu hiện. Cụ thể là, cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền chứa vài EXP khác nhau có tính chất biểu hiện cấu trúc biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS) liên kết linh hoạt với UTR 3' *Medicago* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1). Các cây đậu tương đã được biến nạp UTR 3' *Medicago* này được so sánh với cây đậu tương đã được biến nạp trong đó gen chuyển GUS đã được liên kết linh hoạt với UTR 3' thu được từ *Gossypium barbadense*.

Các vật truyền dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được chứa vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để chọn lọc tế bào thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng spectinomycin kháng sinh (được khiến cho hoạt động bằng trình tự khởi đầu Actin 7 *Arabidopsis*); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai dùng để đánh giá hoạt tính của UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) mà chứa các yếu tố EXP, EXP-Mt.AC145767v28:1:1 (SEQ ID NO: 35), EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 52), EXP-CERV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 53), EXP-DaMV.FLT:1:2 (SEQ ID NO: 51), EXP-CUCme.eEF1a:1:1 (SEQ ID NO: 54), hoặc EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44) mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' T-

Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) thu được từ *Medicago truncatula*, hoặc với UTR 3' T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40) hoặc T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41) thu được từ *Gossypium barbadense*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*. Các vật truyền chứa T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) là pMON118798, pMON116815, pMON118769, pMON153709, pMON118771, pMON153707, và pMON155502. Cụ thể, vật truyền pMON118798 chứa EXP-Mt.AC145767v28:1:1 tự nhiên mà chứa yếu tố của trình tự khởi đầu liên kết linh hoạt với yếu tố của trình tự dẫn đầu đã được tách dòng từ cùng locus gen như UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1). Các vật truyền chứa UTR 3' từ *Gossypium barbadense* là pMON102167, pMON113874, pMON121030, pMON121042, pMON140827, và pMON125841.

Bảng 23 thể hiện cấu trúc plasmit có yếu tố EXP, UTR 3', và SEQ ID NO tương ứng dùng để biến nạp cây đậu tương nêu trong Ví dụ này.

Bảng 23. Cấu trúc plasmit dùng để biến nạp cây đậu tương và yếu tố EXP và UTR 3' tương ứng.

Cấu trúc plasmit	Mô tả EXP	EXP SEQ ID NO:	Mô tả UTR 3'	3' UTR SEQ ID NO:
pMON118798	EXP-Mt.AC145767v28:1:1	35	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON102167	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON116815	EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	42	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON113874	EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	52	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118769	EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	52	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON121030	EXP-CERV.FLT:1:2	53	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON153709	EXP-CERV.FLT:1:2	53	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON121042	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Gb.E6-3b:1:1	40
pMON118771	EXP-DaMV.FLT:1:2	51	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON140827	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	54	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON153707	EXP-CUCme.eEF1a:1:1	54	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1
pMON125841	EXP-Mt.Ubq2:1:2	31	T-Gb.FbL2-1:1:1	41
pMON155502	EXP-Mt.Ubq2:1:2	31	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1

Cây đậu tương đã được biến nạp và GUS được thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 3. Bảng 24 và bảng 25 đưa ra trị số GUS trung bình định lượng đối với thể hệ Ro

của cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định. Các tế bào nêu trong bảng này được ký hiệu là “bdl” biểu thị các mô mà được phân tích định lượng nhưng trong đó mức độ biểu hiện thấp hơn mức độ có thể phát hiện được. Bảng 26 và bảng 27 nêu số lần khác biệt về mức độ biểu hiện của mỗi yếu tố EXP liên kết linh hoạt với T-Mt.AC145767v28-1:1:2 so với T-Gb.E6-3b:1:1 (SEQ ID NO: 40).

Bảng 24. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₀ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1 và Hoa R1.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Rễ Vn5	Rễ R1	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	59,00	71,00	32,00	34,00	33,00	23,00	bdl
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	400,90	618,03	551,61	605,29	350,93		412,30
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	3817,28		1939,40	3250,38	1393,65	1001,37	876,08
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	111,12		19,96	19,46	17,47	88,14	64,38
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	6514,58	1081,72	477,98	419,52	227,72	1380,90	581,97
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	378,02		344,15	480,25	177,64	285,15	130,87
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	6711,26		1618,72	3262,73	2995,09	5071,90	3608,75
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	780,79		688,93	509,35	320,02	379,69	467,94
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	9322,50	3655,79	5870,15	3923,47	2313,08	3610,84	2131,16
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	189,24	153,52	59,60	37,44	103,01	130,60	130,38
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	2300,06		160,99	216,21	744,44	1628,65	405,97
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	800,93		202,73	275,48	143,60	1195,97	482,13
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	855,00		293,68	1118,76	254,25	875,67	398,10

Bảng 25. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₀ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3 và Lá mầm R5.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
EXP-Mt.AC145767v28:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	31,00	27,00	bdl	bdl	26,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	47,86	49,45	67,45	433,54	101,34
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	358,03	1192,69	989,47	2309,72	566,93
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	28,31	62,63	24,08	115,00	11,35
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	547,47	207,69	128,15	927,48	65,67
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	68,57	70,12	64,42	264,62	34,43
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1474,35	4242,09	2441,01	7209,69	900,82
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	104,58	115,16	340,02	859,14	64,18
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	2806,65	1814,87	518,90	3720,59	401,66
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	200,28	291,26	58,21	131,17	114,29
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1029,69	1883,48	209,77	1122,51	521,64
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	129,84	83,45	400,15	875,75	72,66
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2			247,18	1324,98	352,81

Bảng 26. Số lần khác biệt của mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Rễ Vn5, Lá dự trữ Vn5, Lá nguồn Vn5, Lá nguồn R1, Cuống lá R1 và Hoa R1.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00		1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	9,52	3,52	5,37	3,97		2,12
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	58,63	23,94	21,56	13,03	15,67	9,04
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	17,75	4,70	6,79	16,86	17,79	27,57
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	11,94	8,52	7,70	7,23	9,51	4,55
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	12,15	2,70	5,77	7,23	12,47	3,11
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	1,07	1,45	4,06	1,77	0,73	0,83

Bảng 27. Số lần khác biệt của mức độ biểu hiện ở cây đậu tương đã được biến nạp thể hệ R₁ ở Phôi vỏ màu vàng, Lá mầm vỏ màu vàng, Hạt chưa chín R3, Vỏ R3 và Lá mầm R5.

Mô tả EXP	Mô tả UTR 3'	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	7,48	24,12	14,67	5,33	5,59
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-BSAcVNV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	19,34	3,32	5,32	8,07	5,78
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CERV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	21,50	60,50	37,89	27,25	26,16
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Gb.E6-3b:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-DaMV.FLT:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	26,84	15,76	1,53	4,33	6,26
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Gb.FbL2-1:1:1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EXP-CUCme.eEF1a:1:1	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	5,14	6,47	3,60	8,56	4,56
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Gb.FbL2-1:1:1			1,00	1,00	1,00
EXP-Mt.Ubq2:1:2	T-Mt.AC145767v28-1:1:2			0,62	1,51	4,86

Như đã được thể hiện trong bảng 24 và bảng 25, UTR 3' *Medicago* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) thúc đẩy sự biểu hiện của sáu yếu tố EXP cơ định so với T-Gb.E6-3b:1:1(SEQ ID NO: 40), nhưng theo nhiều cách tùy theo yếu tố EXP và mô cụ thể. Yếu tố EXP, EXP-Mt.AC145767v28:1:1, khi được sử dụng để khiến cho GUS hoạt động và liên kết linh hoạt với UTR 3' tự nhiên của nó T-Mt.AC145767v28-1:1:2 được biểu hiện với mức độ rất thấp ở tất cả các mô đã được thử nghiệm và không thể phát hiện được ở Hạt chưa chín R3, Vỏ R3, và Hoa R1. Một số mô của thực vật chứa yếu tố EXP EXP-Mt.Ubq2:1:2 và UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 chứng tỏ mức độ biểu hiện giảm so với dạng kết hợp của EXP-Mt.Ubq2:1:2 và T-Gb.FbL2-1:1:1. Quan sát thấy sự biểu hiện giảm này ở Hạt chưa chín R3, Hoa R1, và Cuống lá R1 trong khi đó, ngược lại, mức độ biểu hiện ở Lá dự trữ Vn5 và Lá mầm R5 được gia tăng mạnh hơn bốn lần. Không có thay đổi nào đối với mức độ biểu hiện ở Rễ (Rễ Vn5) với EXP-Mt.Ubq2:1:2 và mỗi UTR 3'.

Các nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-CERV.FLT:1:2 và EXP-DaMV.FLT:1:2 tạo ra mức độ biểu hiện cao nhất. Như được thể hiện trong bảng 26 và bảng 27, hai EXP này được gia tăng ở tất cả các mô với T-Mt.AC145767v28-1:1:2 so với cùng EXP được kết hợp với T-Gb.E6-3b:1:1(SEQ ID NO: 40). Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-CERV.FLT:1:2 được gia tăng 60,50 lần ở Lá mầm vỏ màu vàng đang phát triển và nhỏ hơn ở Phôi vỏ màu vàng (21,50 lần), trong khi nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-DaMV.FLT:1:2 được gia tăng với mức độ lớn hơn ở Phôi vỏ màu vàng so với ở Lá mầm vỏ màu vàng (mức gia tăng lần lượt là 26,80 lần so với 15,76 lần). Các khác biệt về mức độ biểu hiện và mức gia tăng mang lại cơ hội để tạo ra mức độ biểu hiện được điều chỉnh của gen chuyển ở hạt phát triển trong giai đoạn muộn hơn. Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 được biểu hiện với mức độ cao nhất ở Vỏ R3 và Rễ Vn5 khi kết hợp với T-Gb.E6-3b:1:1 (xem các bảng 25 và 26). Mức độ biểu hiện của EXP-BSAcVNV.FLT:1:2 ở hai mô này được gia tăng đột ngột khi kết hợp với T-Mt.AC145767v28-1:1:2, đặc biệt là ở Rễ Vn5. Ngoài ra, mức độ biểu hiện của EXP-

BSAcVNV.FLT:1:2 được thúc đẩy 58,63 lần khi kết hợp với T-Mt.AC145767v28-1:1:2 so với cùng EXP này kết hợp với T-Gb.E6-3b:1:19 (SEQ ID NO: 40)

Tóm lại, UTR 3' *Medicago truncatula* T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) làm gia tăng mức độ biểu hiện của sáu yếu tố EXP cơ định khác nhau mà thu được từ cả thực vật và ADN hệ gen virus của thực vật. Ngoài ra, UTR 3' này làm gia tăng mức độ biểu hiện của yếu tố EXP được ưu tiên của hạt EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO: 54) so với hầu hết các UTR 3' thu được từ *Medicago* khác. Do đó, UTR 3' này phù hợp để tạo ra sự biểu hiện gia tăng của trình tự khởi đầu hoặc hỗn hợp của các yếu tố biểu hiện liên kết linh hoạt trong cấu trúc.

Ví dụ 7

Phân tích EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) ở cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vật truyền, cụ thể là cấu trúc plasmid, chứa nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP cơ định-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa GUS. Sau đó, các thực vật đã được biến nạp này được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định.

Các vật truyền của thực vật dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được chứa vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để chọn lọc tế bào thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng spectinomycin kháng sinh (được khiến cho hoạt động bằng trình tự khởi đầu Actin 7 *Arabidopsis*); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai được dùng để đánh giá hoạt tính của EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) mà chứa EXP-Mt.Ubq2:1:2 liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa β -glucuronidaza (GUS) mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44) liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với UTR 3' T-Mt.AC145767v28-1:1:2 (SEQ ID NO: 1) thu được từ *Medicago truncatula*, hoặc UTR 3' T-Gb.E6-3b:1:1

(SEQ ID NO: 40) hoặc T-Gb.FbL2-1:1:1 (SEQ ID NO: 41) thu được từ *Gossypium barbadense*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*.

Các vật truyền thu được được dùng để biến nạp cây đậu tương như được mô tả trong Ví dụ 3. Bảng 28 và bảng 29 thể hiện trị số biểu hiện GUS định lượng trung bình đã được thử nghiệm trong các mô khác nhau và các thời điểm phát triển khác nhau đối với cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định.

Bảng 28. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở lá, rễ và hoa đối với cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định chứa EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31).

Cấu trúc plasmid	Mô tả UTR 3'	Rễ Vn5	Lá dự trữ Vn5	Lá nguồn Vn5	Lá nguồn R1	Cuống lá R1	Hoa R1
pMON125840	T-Gb.E6-3b:1:1	252,58	126,69	86,01	49,05	108,41	83,23
pMON125841	T-Gb.FbL2-1:1:1	800,93	202,73	275,48	143,6	1195,97	482,13
pMON155502	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	855	293,68	1118,76	254,25	875,67	398,1

Bảng 29. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở mô vỏ và mô hạt đối với cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định chứa EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31).

Cấu trúc plasmid	Mô tả UTR 3'	Hạt chưa chín R3	Vỏ R3	Lá mầm R5	Phôi vỏ màu vàng	Lá mầm vỏ màu vàng
pMON125840	T-Gb.E6-3b:1:1	2,22	111,19	3,21	24,31	50,98
pMON125841	T-Gb.FbL2-1:1:1	400,15	875,75	72,66	129,84	83,45
pMON155502	T-Mt.AC145767v28-1:1:2	247,18	1324,98	352,81		

Như đã được thể hiện trong bảng 28 và bảng 29, EXP-Mt.Ubq2:1:2 (SEQ ID NO: 31) có khả năng gây ra mức độ biểu hiện cấu trúc của phân tử ADN có thể phiên mã ở cây đậu tương đã được biến nạp một cách ổn định. Ngoài ra, các UTR 3' khác nhau ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện ở mỗi mô. Ví dụ, việc kết hợp EXP-Mt.Ubq2:1:2 với T-Gb.E6-3b:1:1 dẫn đến mức độ biểu hiện thấp hơn ở tất cả các mô đã được thử nghiệm so với hai UTR 3' khác, T-Gb.FbL2-1:1:1 và T-Mt.AC145767v28-1:1:2. Tuy nhiên, bất kể UTR 3' nào được áp dụng, EXP-Mt.Ubq2:1:2 tạo ra mức độ biểu hiện cấu trúc từ trung

bình đến cao, mức độ biểu hiện có thể được điều biến bằng cách chọn lọc UTR 3' nào được liên kết linh hoạt với EXP.

Ví dụ 8

Gen tăng cường thu được từ yếu tố điều hòa

Gen tăng cường có thể thu được từ các yếu tố của trình tự khởi đầu theo sáng chế, như trình tự nêu trong SEQ ID NO: 32 và SEQ ID NO: 36. Yếu tố tăng cường có thể cấu thành bởi một hoặc nhiều yếu tố điều hòa cis mà, khi liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' với yếu tố của trình tự khởi đầu, hoặc liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' với yếu tố tăng cường khác mà được liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu, có thể tăng cường hoặc điều biến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã, hoặc gây ra sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã ở loại tế bào hoặc cơ quan thực vật đặc hiệu hoặc vào thời điểm cụ thể trong sự phát triển hoặc nhịp sinh học ngày đêm. Gen tăng cường được tạo ra bằng cách loại bỏ hộp TATA hoặc các yếu tố có chức năng tương tự và trình tự nằm sau bất kỳ mà cho phép sự phiên mã được khởi đầu từ trình tự khởi đầu hoặc đoạn của trình tự khởi đầu.

Yếu tố tăng cường có thể thu được từ các yếu tố của trình tự khởi đầu theo sáng chế và được tách dòng bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' với yếu tố của trình tự khởi đầu, hoặc liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' với yếu tố tăng cường khác mà liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu. Theo cách khác, yếu tố tăng cường có thể được tách dòng, bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, để liên kết linh hoạt với một hoặc nhiều bản sao của yếu tố tăng cường mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' với yếu tố của trình tự khởi đầu, hoặc liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' với yếu tố tăng cường khác mà được liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu. Ngoài ra, yếu tố tăng cường có thể được tách dòng để liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' với yếu tố của trình tự khởi đầu thu được từ giống sinh vật khác, hoặc liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' hoặc đầu tận cùng 3' với yếu tố tăng cường khác thu được từ giống sinh vật khác hoặc

cùng giống sinh vật mà được liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu thu được từ cùng một giống sinh vật hoặc sinh vật khác, tạo ra yếu tố điều hòa khảm. Vật truyền biến nạp thực vật biểu hiện GUS có thể được tạo cấu trúc bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này tương tự như cấu trúc được bộc lộ trong các Ví dụ nêu trên, trong đó vật truyền biểu hiện thực vật thu được chứa vùng biên trái từ *A. tumefaciens*; catxet chọn gen chuyển thứ nhất mà mang lại tính kháng kháng sinh hoặc diệt cỏ và được sử dụng để chọn tế bào thực vật đã được biến nạp; và catxet gen chuyển thứ hai trong đó yếu tố tăng cường liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu tạo ra yếu tố của trình tự khởi đầu khảm, mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu, mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), liên kết linh hoạt với UTR 3' như T-Gb.E6-3b:1:1 hoặc UTR 3' bất kỳ nêu trên từ *Medicago truncatula*; và vùng biên phải từ *A. tumefaciens*.

Sự biểu hiện GUS được khiến cho xảy ra bằng yếu tố điều hòa chứa một hoặc nhiều gen tăng cường có thể được đánh giá ở các thử nghiệm thực vật ổn định hoặc nhất thời như được bộc lộ trong bản mô tả này để xác định các tác động của yếu tố tăng cường đến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã. Các cải biến đối một hoặc nhiều yếu tố tăng cường hoặc sự nhân đôi của một hoặc nhiều yếu tố tăng cường có thể được thực hiện dựa trên thử nghiệm theo kinh nghiệm, và sự điều hòa biểu hiện gen thu được mà được quan sát bằng cách sử dụng mỗi chế phẩm chứa yếu tố điều hòa. Việc làm thay đổi vị trí tương đối của một hoặc nhiều gen tăng cường ở yếu tố điều hòa hoặc yếu tố điều hòa khảm thu được có thể tác động đến hoạt tính hoặc tính đặc hiệu phiên mã của yếu tố điều hòa hoặc yếu tố điều hòa khảm và được xác định theo kinh nghiệm để xác định gen tăng cường tốt nhất đối với tính chất biểu hiện gen chuyển mong muốn ở thực vật.

Ví dụ 9

Phân tích tác động của UTR 3' đến sự biểu hiện GUS cấu trúc ở cây ngô đã được biến nạp một cách ổn định

Cây ngô đã được biến nạp bằng cấu trúc plasmit hai thành phần để đánh giá tác động của UTR 3' *Medicago* T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) đến sự biểu hiện so với

hai UTR 3' đã được sử dụng thường xuyên ở cây ngô. Cụ thể là, cây ngô đã được biến nạp bằng vật truyền chứa EXP mà thể hiện tính chất biểu hiện cấu trúc biểu hiện gen chuyển β -glucuronidaza (GUS), mà được liên kết linh hoạt với UTR 3' *Medicago* T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17). Các cây ngô đã được biến nạp này được so sánh với cây ngô đã được biến nạp, trong đó GUS liên kết linh hoạt với UTR 3' T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 49) hoặc UTR 3' T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56).

Cấu trúc plasmid hai thành phần dùng trong các thử nghiệm này được xây dựng bằng cách áp dụng các phương pháp tách dòng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vật truyền thu được chứa vùng biên phải từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất để thử nghiệm trình tự UTR 3', trong đó nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa EXP cơ định-FMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Zm.DnaK:1:2 (SEQ ID NO: 56) liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), mà được liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với một trong số ba UTR 3' sau: T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17), T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 49) hoặc T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56); catxet biểu hiện gen chuyển thứ hai được sử dụng để chọn tế bào của thực vật đã được biến nạp mà mang lại tính kháng đối với glyphosat diệt cỏ (được khiến cho hoạt động bằng trình tự khởi đầu Actin 1 cây lúa); và vùng biên trái từ *A. tumefaciens*. Các plasmid thu được được dùng để biến nạp cây ngô.

Phân tích GUS hóa mô đã được sử dụng để phân tích sự biểu hiện định tính của thực vật đã được biến nạp. Các phần mô nguyên vẹn được ủ với dung dịch nhuộm màu chứa GUS X-Gluc (5-bromo-4-clo-3-indolyl-b-glucuronit) (1mg/ml) trong khoảng thời gian thích hợp, được rửa, và quan sát bằng mắt về sự chuyển màu thành màu xanh nước biển. Hoạt tính GUS đã được xác định định tính bằng cách quan sát trực tiếp bằng mắt hoặc quan sát qua kính hiển vi bằng cách sử dụng các bộ phận và mô của thực vật được chọn. Thực vật R₀ được quan sát về mức độ biểu hiện ở rễ và lá, cũng như bao phấn, râu, và hạt và phôi đang phát triển, 21 ngày sau khi thụ phấn (21 DAP).

Phân tích định lượng đối với cây ngô đã được biến nạp cũng được thực hiện. Để phân tích định lượng, tổng protein được chiết từ mô được chọn của cây ngô đã được biến

nạp. Một microgam tổng protein được sử dụng với cơ chất sinh huỳnh quang 4-metyeumbelliferyl- β -D-glucuronit (MUG) trong tổng thể tích hỗn hợp phản ứng là 50 μ l. Sản phẩm phản ứng, 4-methlyumbeliferon (4-MU), phát huỳnh quang mạnh nhất ở độ pH cao, khi nhóm hydroxyl được ion hóa. Việc bổ sung dung dịch kiềm chứa natri cacbonat đồng thời dừng thử nghiệm này và điều chỉnh độ pH để định lượng sản phẩm huỳnh quang. Mức phát huỳnh quang được đo với kích thích ở bước sóng 365nm, phát xạ ở bước sóng 445nm bằng cách sử dụng Fluoromax-3 (Horiba; Kyoto, Nhật Bản) với thiết bị Micromax Reader, với chiều rộng khe hở được thiết lập ở bước sóng kích thích 2nm và phát xạ ở bước sóng 3nm.

Bảng 30 thể hiện mức độ biểu hiện GUS định lượng trung bình đo được chứng tỏ các tác dụng khác nhau của mỗi UTR 3' lên cùng EXP biểu hiện cấu trúc.

Bảng 30. Mức độ biểu hiện GUS trung bình ở cây ngô đã được biến nạp bằng các UTR 3' khác nhau.

Giai đoạn phát triển	Mô	Cấu trúc plasmid		
		pMON128881 T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17)	pMON119693 T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56)	pMON132035 T-AGRtu.nos:13 (SEQ ID NO: 49)
V4	Lá	205	232	222
	Rễ	126	134	44
V7	Lá	277	534	293
	Rễ	không xác định	135	không xác định
VT	Lá	314	429	194
	Rễ	198	1043	291
	Hoa/Bao phấn	527	486	308
R1	Lõi/Râu	169	1258	319
R3	Phôi 21DAP	179	72	101
	Nội nhũ 21DAP	516	207	243

Như có thể thấy được trong Bảng 30, mỗi UTR 3' có tác động khác nhau đến mức độ biểu hiện cấu trúc được gây ra bởi EXP-FMV.35S-enh+Ta.Lhcb1+Zm.DnaK:1:2

(SEQ ID NO: 56). Ví dụ, UTR 3' T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56) dường như làm gia tăng mức độ biểu hiện ở Rễ VT và Lõi/Râu R1 so với hai UTR 3' khác. UTR 3' T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) dường như làm gia tăng mức độ biểu hiện ở Hạt R3, cả hai đều ở Nội nhũ 21DAP và Phôi 21DAP so với T-AGRtu.nos-1:1:13 (SEQ ID NO: 49) và T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO: 56). Mức độ biểu hiện ở Hoa/Bao phấn cũng cao hơn khi sử dụng T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO: 17) so với hai UTR 3' khác. Các khác biệt về mức độ biểu hiện quan sát được đối với mỗi UTR 3' chứng tỏ tính hữu dụng của mỗi UTR 3' trong việc điều biến sự biểu hiện. Do đó, các thử nghiệm này cho thấy rằng việc chọn lọc UTR 3' có thể được áp dụng trong catxet gen chuyển để tinh chỉnh mức độ biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã cụ thể. Thử nghiệm này cũng chứng tỏ khả năng của UTR 3' thu được từ cây hai lá mầm, như T-Mt.Oxr-1:2:1, ảnh hưởng đến sự phiên mã ở các loài cây một lá mầm như cây ngô.

Ví dụ 10

Phân tích sự tăng cường intron của hoạt tính GUS bằng cách sử dụng thể nguyên sinh thu được từ thực vật

Nói chung, intron được chọn dựa trên thử nghiệm và sự so sánh với đối chứng là vật truyền không có intron để chọn lọc theo kinh nghiệm intron và cấu hình bên trong sự sắp xếp của yếu tố ADN vận chuyển (T-ADN) vật truyền để biểu hiện tối ưu gen chuyển. Ví dụ, trong sự biểu hiện của gen có tính kháng cỏ, như CP4 (US RE39247), mà mang lại sự dung nạp với glyphosat, điều mong muốn là có sự biểu hiện gen chuyển ở mô sinh sản cũng như mô sinh dưỡng để ngăn ngừa mức hao hụt năng suất khi sử dụng chất diệt cỏ. Trong trường hợp này, intron sẽ được chọn dựa vào khả năng của nó, khi liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu cơ định, để nâng cao mức độ biểu hiện của gen chuyển mang lại tính kháng cỏ, đặc biệt là ở các tế bào và mô sinh sản của thực vật chuyển gen, và do đó tạo ra sự dung nạp ở cả mô sinh dưỡng và mô sinh sản cho thực vật chuyển gen khi phun chất diệt cỏ. Trong hầu hết các gen ubiquitin, UTR 5' được cấu thành bởi trình tự dẫn đầu, mà có trình tự intron được lồng vào trong nó. Do đó, yếu tố điều hòa thu được từ gen này được thử nghiệm bằng cách sử dụng UTR 5' hoàn chỉnh chứa trình tự khởi đầu,

trình tự dẫn đầu, và intron. Để đạt được các tính chất biểu hiện khác nhau hoặc để điều chỉnh mức độ biểu hiện của gen chuyên, intron từ yếu tố điều hòa này có thể được loại bỏ hoặc được thế bằng intron khác loài.

Intron được thể hiện trong bản mô tả này trong SEQ ID NO: 34 đã được xác định bằng cách sử dụng đoạn trình tự liên tục ADN hệ gen so với cụm đuôi trình tự được biểu hiện, hoặc đoạn trình tự liên tục ADN bổ trợ, để xác định các trình tự exon và intron trong ADN hệ gen. Ngoài ra, UTR 5' hoặc các trình tự dẫn đầu còn được sử dụng để xác định mối tách intron/exon của một hoặc nhiều intron trong các điều kiện nêu trình tự gen ghi mã trình tự dẫn đầu mà bị ngắt quãng bởi một hoặc nhiều intron. Các intron đã được tách dòng bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này vào vật truyền biến nạp thực vật để liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 3' với yếu tố điều hòa và đoạn của trình tự dẫn đầu và liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với đoạn của trình tự dẫn đầu thứ hai hoặc với trình tự mã hóa, như các catxet biểu hiện được thể hiện trên Hình 1.

Do đó, ví dụ, catxet biểu hiện có thể có thứ nhất, như Cấu hình của catxet biểu hiện 1 được thể hiện trên Hình 1, cấu thành bởi yếu tố của trình tự khởi đầu hoặc yếu tố của trình tự khởi đầu khảm [A], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu [B], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố intron thử nghiệm [C], liên kết linh hoạt với vùng mã hóa [D], mà được liên kết linh hoạt với yếu tố UTR 3' [E]. Theo cách khác, catxet biểu hiện có thể có thứ hai, như Cấu hình của catxet biểu hiện 2 được thể hiện trên Hình 1, cấu thành bởi trình tự khởi đầu hoặc yếu tố của trình tự khởi đầu khảm [F], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu thứ nhất hoặc đoạn của yếu tố của trình tự dẫn đầu thứ nhất [G], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố intron thử nghiệm [H], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu thứ hai hoặc đoạn thứ hai của yếu tố của trình tự dẫn đầu thứ nhất [I], liên kết linh hoạt với vùng mã hóa [J], mà được liên kết linh hoạt với yếu tố UTR 3' [K]. Ngoài ra, catxet biểu hiện có thể có thứ ba, như Cấu hình của catxet biểu hiện 3 được thể hiện trên Hình 1, bao gồm yếu tố của trình tự khởi đầu hoặc yếu tố của trình tự khởi đầu khảm [L], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố của trình tự dẫn đầu [M], liên

kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với đoạn thứ nhất của yếu tố của trình tự mã hóa [N], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố intron [O], liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với đoạn thứ hai của yếu tố của trình tự mã hóa [P], mà liên kết linh hoạt với yếu tố UTR 3' [Q]. Điều đáng lưu ý là, cấu hình của catxet biểu hiện 3 được thiết kế để cho phép tách intron theo cách như khi tạo ra khung đọc mở hoàn chỉnh mà không làm dịch khung giữa đoạn thứ nhất và đoạn thứ hai của trình tự mã hóa.

Như được bàn luận trong bản mô tả này, tốt hơn nếu có thể tránh sử dụng trình tự nucleotit AT hoặc nucleotit A ngay trước đầu tận cùng 5' của vị trí tách intron (GT) và nucleotit G hoặc trình tự nucleotit TG, lần lượt ngay sau đầu tận cùng 3' của vị trí tách intron (AG) để loại bỏ khả năng tạo ra các codon khởi đầu không mong muốn trong khi xử lý ARN thông tin thành sản phẩm phiên mã cuối cùng. Do đó, trình tự ADN xung quanh vị trí tách intron ở đầu tận cùng 5' hoặc 3' của intron có thể được cải biến.

Các intron có thể được thử nghiệm về tác dụng tăng cường thông qua khả năng tăng mức độ biểu hiện trong thử nghiệm nhất thời hoặc thử nghiệm thực vật ổn định. Đối với thử nghiệm nhất thời về sự tăng cường intron, vật truyền của thực vật cơ bản được tạo cấu trúc bằng cách áp dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Intron được tách dòng vào vật truyền của thực vật cơ bản mà chứa catxet biểu hiện cấu thành bởi EXP cơ định chứa trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu như EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố intron thử nghiệm (ví dụ, một trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34), liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), liên kết linh hoạt với UTR 3' từ (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 40). Các tế bào của thể nguyên sinh thu được từ mô đậu tương hoặc mô giống thực vật khác có thể được biến nạp bằng vật truyền của thực vật cơ bản và vật truyền kiểm soát Luxiferaza như đã được bộc lộ trong Ví dụ 2 nêu trên, và được thử nghiệm về hoạt tính. Để so sánh hoạt tính tương đối của intron nhằm tăng mức độ biểu hiện, trị số GUS được biểu thị theo tỷ lệ giữa hoạt tính GUS với hoạt tính luxiferaza và so với các mức độ này được truyền bởi cấu trúc chứa trình tự khởi đầu cơ định liên kết linh hoạt với chuẩn intron đã biết như intron thu được từ yếu tố kéo dài

Nicotiana tabacum gen 4A10, I-Nt.eIF4A10-1:1:1 (SEQ ID NO: 57), cũng như cấu trúc chứa trình tự khởi đầu cơ định, nhưng không chứa intron liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu.

Đối với thử nghiệm về thực vật ổn định chứa intron được thể hiện trong SEQ ID NO: 34, vật truyền biến nạp của thực vật biểu hiện GUS có thể được xây dựng tương tự như các cấu trúc đã được bộc lộ trong các ví dụ nêu trên, trong đó vật truyền biểu hiện thực vật thu được chứa vùng biên phải từ *A. tumefaciens*; catxet biểu hiện gen chuyển thứ nhất chứa EXP cơ định cấu thành bởi trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu như EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO: 42), liên kết linh hoạt ở đầu tận cùng 5' với yếu tố intron thử nghiệm (ví dụ, trình tự nêu trong SEQ ID NO: 34), liên kết linh hoạt với trình tự mã hóa GUS mà có intron có thể xử lý (GUS-2, SEQ ID NO: 44), liên kết linh hoạt với UTR 3' từ *Gossypium barbadense* (T-Gb.E6-3b:1:1, SEQ ID NO: 40). Các tế bào của thể nguyên sinh thu được từ mô của cây ngô hoặc mô của giống thực vật khác có thể được biến nạp bằng vật truyền của thực vật cơ bản và vật truyền đối chứng của luxiferaza, như đã được bộc lộ trong Ví dụ 2 nêu trên, và được thử nghiệm về hoạt tính. Để so sánh khả năng tương đối của intron nhằm tăng mức độ biểu hiện, trị số GUS được biểu thị theo tỷ lệ giữa hoạt tính GUS với hoạt tính luxiferaza và so với các mức độ này được truyền bởi cấu trúc chứa trình tự khởi đầu cơ định liên kết linh hoạt với chuẩn intron đã biết như intron thu được từ yếu tố kéo dài *Nicotiana tabacum* gen 4A10, I-Nt.eIF4A10-1:1:1 (SEQ ID NO: 57), cũng như cấu trúc chứa trình tự khởi đầu cơ định, nhưng không chứa intron liên kết linh hoạt với trình tự khởi đầu.

Cần lưu ý rằng intron được thể hiện trong SEQ ID NO: 34 có thể được cải biến theo nhiều cách, như làm khuyết các đoạn ở trong trình tự intron, mà có thể làm giảm mức độ biểu hiện hoặc sự nhân đôi của các đoạn với intron mà có thể làm tăng mức độ biểu hiện. Ngoài ra, các trình tự ADN ở trong intron mà có thể ảnh hưởng đến tính đặc hiệu của mức độ biểu hiện đối với loại tế bào hoặc mô và cơ quan cụ thể có thể được nhân đôi hoặc được biến đổi hoặc được làm mất đi để ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện và kiểu biểu hiện của gen chuyển. Ngoài ra, intron theo sáng chế có thể được cải biến để

loại bỏ codon khởi đầu (ATG) có thể có bất kỳ mà có thể tạo ra sản phẩm phiên mã không định trước khi biểu hiện được từ intron được phân đoạn không thích hợp dưới dạng các protein khác nhau, dài hơn hoặc bị cắt cụt. Nếu intron được thử nghiệm theo kinh nghiệm, hoặc nó được biến đổi dựa vào thử nghiệm, intron có thể được dùng để tăng mức độ biểu hiện của gen chuyển ở thực vật đã được biến nạp một cách ổn định mà có thể là giống cây một lá mầm hoặc hai lá mầm bất kỳ, chừng nào intron còn tạo ra sự tăng cường cho gen chuyển. Intron này cũng có thể được dùng để tăng mức độ biểu hiện ở các sinh vật khác, như tảo, nấm, hoặc tế bào động vật, chừng nào intron còn tạo ra sự tăng cường hoặc sự suy giảm hoặc tính đặc hiệu của sự biểu hiện của gen chuyển mà nó liên kết linh hoạt với.

Như đã được minh họa và mô tả các nguyên lý của sáng chế, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần phải hiểu rõ rằng sáng chế có thể được cải biến ở sự sắp xếp và chi tiết mà không nằm ngoài các nguyên lý này. Các tác giả sáng chế hoặc người nộp đơn yêu cầu bảo hộ tất cả các cải biến nằm trong ý tưởng và phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ. Tất cả các tài liệu công bố và các tài liệu sáng chế đã được công bố được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn ở chừng mực nếu từng tài liệu công bố hoặc đơn yêu cầu cấp patent được chỉ ra một cách cụ thể và riêng lẻ để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm:

- a) trình tự ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 85 phần trăm với SEQ ID NO: 16;
- b) trình tự ADN chứa SEQ ID NO: 16; và
- c) đoạn chứa ít nhất 200 nucleotit liên kề của SEQ ID NO: 16, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen;

trong đó trình tự ADN này liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài.

2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN này có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 90 phần trăm với trình tự ADN của SEQ ID NO: 16.

3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN này có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 95 phần trăm với trình tự ADN của SEQ ID NO: 16.

4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử polynucleotit có thể phiên mã khác loài chứa gen đáng quan tâm về mặt nông học.

5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó gen đáng quan tâm về mặt nông học tạo ra tính dung nạp thuốc diệt cỏ ở thực vật.

6. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 4, trong đó gen đáng quan tâm về mặt nông học tạo ra tính kháng loài gây hại ở thực vật.

7. Tế bào của thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm:

- a) trình tự ADN có mức độ tương đồng về trình tự ít nhất 85 phần trăm với SEQ ID NO: 16;
- b) trình tự ADN chứa SEQ ID NO: 16; và

c) đoạn chứa ít nhất 200 nucleotit liền kề của SEQ ID NO: 16, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen;

trong đó trình tự ADN này liên kết linh hoạt với phân tử ADN có thể phiên mã khác loài.

8. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 7, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này là tế bào của cây một lá mầm.

9. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 7, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này là tế bào của cây hai lá mầm.

10. Thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.

11. Phần của thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.

12. Thực vật thế hệ con của thực vật chuyển gen theo điểm 10, trong đó thực vật thế hệ con chứa phân tử ADN tái tổ hợp đã nêu.

13. Phần của thực vật thế hệ con của thực vật chuyển gen theo điểm 10, trong đó phần của thực vật thế hệ con chứa phân tử ADN tái tổ hợp đã nêu.

14. Hạt chuyển gen của thực vật chuyển gen theo điểm 10 trong đó hạt chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp.

15. Phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa bao gồm bước thu nhận thực vật chuyển gen theo điểm 10 hoặc phần của nó và sản xuất sản phẩm hàng hóa từ đó.

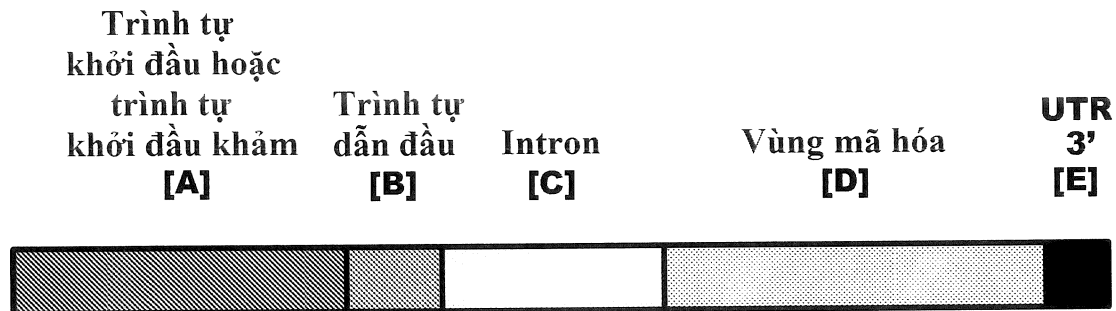
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó sản phẩm hàng hóa là dịch cô đặc protein, dịch phân lập protein, hạt ngũ cốc, tinh bột, hạt, bột xay thô, bột, sinh khối, hoặc dầu hạt.

17. Phương pháp tạo ra thực vật chuyển gen bao gồm các bước:

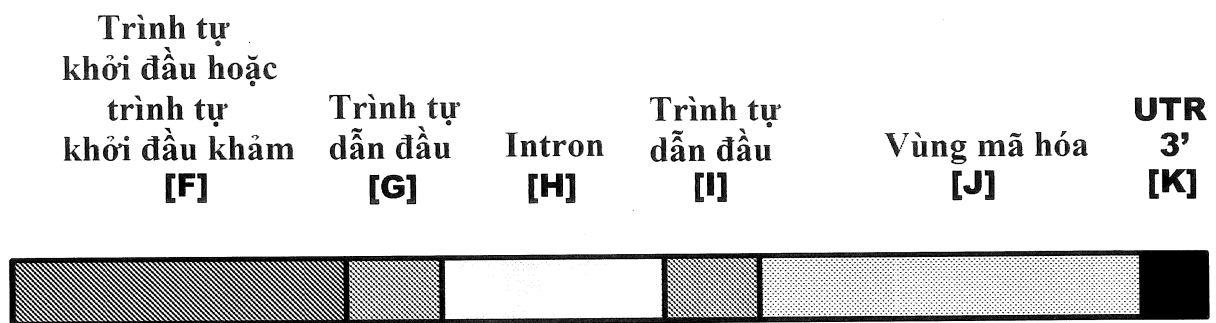
a) biến nạp tế bào thực vật với phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1 để tạo ra tế bào thực vật đã biến nạp; và

b) tái tạo thực vật chuyển gen từ tế bào thực vật đã được biến nạp.

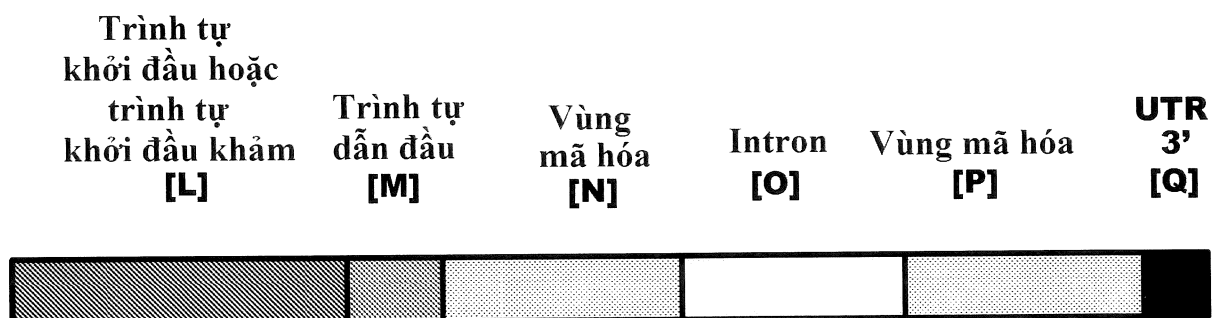
Cấu hình băng gen chuyển 1



Cấu hình băng gen chuyển 2



Cấu hình băng gen chuyển 3



HÌNH 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP MANG YẾU TỐ ĐIỀU HÒA ĐẶC TÍNH DUNG NẠP THUỐC DIỆT CỎ VÀ KHÁNG VẬT GÂY HẠI Ở THỰC VẬT, THỰC VẬT CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM HÀNG HÓA VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA THỰC VẬT CHUYỂN GEN

<130> MONS:332WO

<150> 61/785,268

<151> 2014-03-14

<160> 57

<210> 1

<211> 500

<212> ADN

<213> Medicago truncatula

<400> 1

```
ttaatcatct gaaactgttc accatgcatg caatcttgtg aaatatatgg ttttaattag 60
acttcaatct tatgttggct attgtactaa taaaagcatg tcatgttatt ttcatttgat 120
tttatctgta ctttggtttg tttgaagaat aaagatgagc ttgctatgca tgcatgcatg 180
ccatcgatta tcagggtttc cttttttctt ttctggcttc ccatcaattt ggtgtgaatt 240
agtgtgtgtg atatattata ttatgctatt tatgaaataa attgttgggtt atatttgatc 300
tacaatctac atacatgtga tttttatcaa caaaatatct cgggaaacaa tacctttttg 360
gtagcaaaat tcaaataata ctattttaaa taaatcaaag ttaaccaata ctttattcaa 420
gttggagggg tctcaaacaa gcaaaagaat tcaagttggtt aatgaacttc ggttaatgat 480
aaaagaattc gcatttaaaa 500
```

<210> 2

<211> 500

<212> ADN

<213> Medicago truncatula

<400> 2

```
aagggtcttc tgtcatgatt tcatactttc attattgagc tctgtaatta caattatgac 60
catgagaaca tctcttattg tgtggccttt taattgctga tgtagtact gaaccaaagc 120
```

ttatcgtgat gatgtaaaag caataagtac ttgtttgtag cttctttgtg tctccctttg 180
 ggcttaatac atctgttttag tggtgtggct ttggcataga cttctcttgg taataatgcc 240
 ttgcaatgca aaatttcaat tatcaaattc tattatgttc tcaccttatg gtaacagctt 300
 accctgtgga agatgagatt cttgagttga gtcattgccca atttttggca ttagcttttg 360
 aattagtga ttttgacaaa aattaccgtg aacttgattt tggtgaagct cttaagtgta 420
 gtttttaciaa aatttcagtg gctcgttgtg attatgtcaa actcacggcg aatgtagttc 480
 ttacagaatt tcagtggctc 500

<210> 3
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 3

gcatgaataa tcaagctcat aaatttcatg gctttgaatt tgtactatth ttggttactag 60
 aaagtgtatt tgtgtgttta tgcagtaata aatctctaag agatatatgt ttgttattht 120
 ttataattat ccaaaaaatc gttaatgttg aaaattgatt caaaattgat attgaagtth 180
 tgaaaaaatc gtggcgtgat taaaaatcca aactthttta taaaataata ttgtgtctat 240
 atctthttata aatgacgata aatgggataa agtaaatgaa acaaaaccgt taatgcaatg 300
 ttcactctga caatatatat aattaaaaaa cattataaaa ccttgthttct tcaactatth 360
 acaatcttga aattthtagtc tttaccatth gaaagtacaa tctthttcatg aaagtthata 420
 gtacaaatca agagtthtga taagctgctc tgctthtttat aatcactggg aatgatttha 480
 tgacttgga aaacaacttg 500

<210> 4
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 4

aaaattgttg ttgaattcca aaagggtcct gtagtagaaa tttacgtaca agcaaaatcg 60
 atthcttgat atacaagtta aagggtatat gagaaaatac atacatgtaa atgagtaccg 120

agttttctat agtttgagca tttgtgtcaa ataagcaagt gattgtgatg attccaagct 180
 tttaaattga aaaaagatta gcaaccaaga atcaaacatc cacacaccat atacatgctc 240
 taggcttcaa ataccattga gcaacattat actctatatatt gtttgatttc aaccaattcc 300
 aagagcttga taattcgcat gagaattata ttatatcaaa aacttttagtg aaagatgctc 360
 caataatttc taaacttggtg atcattttttt ggcattagga ataaggcaaa aatctgcaaa 420
 atgcaataag aaaaaactag ctcatgaata caaagaaaat gttactacaa ctgacatttt 480
 caaaattcaa caataatctt 500

<210> 5
 <211> 465
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 5

ggagcagtgt gtggtgtttg agaggaatgg tgcaccttac ataaatttca cagacattgc 60
 tcttattttg aatgcggggt catcgacatt gggtagtttt tggatgtatt ttgctagaca 120
 cgatgaacgt ggagtttgat tgttttctct attgttgatc ctctgttaaa taacattggt 180
 aagtgataat tcccagctat ttcgggtttta ttattcccca atgttgctct tccgcatgctc 240
 ccaaagtagt ctttgaggtt ctctgtctgcg ttttaattgta ttggaagtaa attaacagca 300
 tcacgactct ttcgtaatta gttactttca aagaattttt ttggcactaa acactaccct 360
 gatggagtgt tcaattttta acatgagaac ttataaaaga tttttaaaca tgagaactta 420
 tcaaaaatat tatgaatggt cgctcgatat gaagtaggca aggtt 465

<210> 6
 <211> 472
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 6

tctaacacca tggttacttc ataagttggt cttttttaat agtttggttat cttgtccgtg 60
 tcttagtttt ttgttattcc agttttatatt ttccagtttt agaaacttac agaactgggt 120
 tcttgatcgg cgatgggtacc gtttttggtt ttaattgtta agagtcttga gaacttgaat 180

ttcaaagggc agcttaaagg ttgacatct taatcttgct gctgaggaat gttgtaattg 240
 cattttatctt acaagacagt ttgttatgt caaatcttat atttatcttt atggttatgt 300
 ttttgaattt ttgttcgtaa tatttgctct tgattgtgtg ttgttggttc cgtgcttgca 360
 attttacttg gaaagattgg ctttctgcag gttggtttta gcctgtttta gctgtcatga 420
 catgtttgat tagtgaattc cagagaacat gcctaattca tgtgcagcag ca 472

<210> 7
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 7

aaataaaatt acttatagat agatttgga ctagatgact agtgttttat tgtttctggt 60
 ttgtgtaatt ctataaatta atgttatctc tatgtccaag aatgttatct ctagtgctct 120
 ttgttgact tggactgaaa ttatggggat tggatttatg tgcttttcat gactcgtcaa 180
 taaatgaata aataaaatgt gacttttctc ctttacttgt tgtgtttggc ttctgatgta 240
 ataagaaatc caatgaatct gctaataatc ttgtgagagt tttagtata taataataat 300
 cctaccgctt caaacatagt ttttggtttt aaaaaaaaaa aaaaaaaca gggaaagtat 360
 attaacaatc tcttagattt atcccagaat aattgaattt tcatctatt atgcttagta 420
 ctattaagta aagctagtga gaggggcatt ttatggctca tcactagagc atgtacaaaa 480
 gaaattgttc tcgtgaattt 500

<210> 8
 <211> 452
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 8

tgagtcaaag ttggtgtctc ttttgaagac tagaaaaagg gtttattttg ttgttatctt 60
 gagtattgtg gtttgacttg cgagacagaa taattgggtg gagttttatc tttttgtttt 120
 ctttttggtc ttttgataat ttcagggtca gtgtacttgg tccaaccoga gcaaaagggt 180
 tattataaaa cactatttcg aagtgaagtt cttttttcaa ttgaaatta tgtggcttca 240

tttacacatt agattctcat cctaaattaa tccgaaattg aatgttggtt taactaatgt 300
 cttgaaaatt gagagtattt tctccagtat tctatagggt ttcttccggt gaggcaaaat 360
 atatgtttat gtgcatcaaa cataaatgtg agtatcattc ttagtcggga ttaaatagga 420
 ctattgagtt tttgtgagca tagcttggtt gg 452

<210> 9
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 9

tgagtcaaag ttggtgtctc ttttgaagac tagaaaaagg gtttattttg ttgttatttt 60
 gagtattgtg gtttgacttg cgagacagaa taattggttg gagttttatc tttttgtttt 120
 ctttttggtc ttttgataat ttcaggttca gtgtacttgg tccaaccga gcaaaaggg 180
 tattataaaa cactatttcg aagtgaagtt cttttttcaa tttgaaatta tgtggcttca 240
 tttacacatt agattctcat cctaaattaa tccgaaattg aatgttggtt taactaatgt 300
 cttgaaaatt gagagtattt tctccagtat tctatagggt ttcttccggt gaggcaaaat 360
 atatgtttat gtgcatcaaa cataaatgtg agtatcattc ttagtcggga ttaaatagga 420
 ctattgagtt tttgtgagca tagcttggtt ggcggagatt ttgctgtata taggggttaa 480
 ttcttggttg gaggagattt 500

<210> 10
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 10

gctgtttcat tactgtggta gtgctataaa ttggcctact ttttgtttct tacagtctat 60
 tagcctagca gccgttaggc ctctttttta aatgtaataa gttgaattcc tgaactcgtg 120
 aagcttgccc cttattgaac cgtagtggtt ttggttgctt aataccatta agcaatgagt 180
 tgttttggtt ttatatgcat ttaccgaatt ttatttggtt gatagtaagc gttttttcca 240
 tgttcacaaa tatgcatga aaaaagcagt aaaatttcaa taaaccaaca tcatgataaa 300

acaaaagtat gcatcgtatg aaaaaaagtg ggtgatgaaa tgataagtct aatttttggtc 360
gaatttggtc gttgttattt ttgcatgaac atctcttttg tacaacctaa caacttattt 420
gctattttta atatttttgt actgcttttg atttgcttgc tcttcacaat attatagtgt 480
tgcattagtt gttcaatttt 500

<210> 11
<211> 500
<212> ADN
<213> Medicago truncatula

<400> 11

tatctcaata tctcaacttc aattcatttg ttgcagtgtt ttgcattggt gtattatcag 60
tgaacatatt tatttatata acatgttcgt tattgttgat gcgggttgat tatgctagag 120
ctgaaactcg agcttgactt tatatatagt taccatatag ttacctatgt tgtatttgag 180
tgttgttttag agattgcaag ttttggttga tcttggtgtc tctgcaaag aagagtaata 240
ttttatgtag aatagggttg tgtgaattaa ttttttagaa tctggattta aactactgcg 300
atcaattgat ttaagccctt ggatagagat cagttgactc acatcgtgac ctcgacaaat 360
tgagtgtttt ttttcttctt tttcggatag aaaaatgtaa gttttgggaa gcagattttc 420
tgctgtaaca gcaggggtgt gtaaagcatc cgagctgtcc ggtcagaatt gtacggccat 480
gatccgggtc tgctcaccaa 500

<210> 12
<211> 500
<212> ADN
<213> Medicago truncatula

<400> 12

acacatatcc aagctctatt actctgtttt taggttgaga atattgtgaa gtgtgttgtg 60
tgtgcgttct gttttatgta aaagtaaatt ctgtgaatta ttttttgtaa ggaataaatt 120
atgtaagaat ggtttaatta tctattgtct cacatcgttt tttatgtcta ttttaagtat 180
tggtattgta ttctatttat acacaagagt taataatagc ataacataaa ttccacaagg 240
atcaagtaaa ataatatcca catgaaacat ctaagaaagg aaaacaatat ggctcaattt 300

cctatctttc tttatttatg ttttagtcat ctttctttcc ctatttcttg ttgaaagcta 360
 ataggagtat ggtactttct acgccathtt tttttaagta ctctctttta cacaatatht 420
 tatcaaattg tagtgacatt ttatttttacg atgcagttaa tgttcgttgt gttactgtca 480
 atgattgtcc aaaggtgaaa 500

<210> 13
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 13

gaacgccaaag acatggcggc ctcttgagct gaatcttctg cttttatttg catttctggt 60
 gtattttaact cctatttttca ccaatgtaac tacacaagca gaagaacctg tatgtggctg 120
 attatatggt agaaatatgg atcccaagaa atgtcaactc ttgtgcatga gttcagaata 180
 tttattgggc tgtcttagtc atgtttttta ttaattttcc gtaacctata tctcttattt 240
 tatgttaatt agtacaaca agacaacaaa agacctagc caaaaataaa atcatcaact 300
 acttaaaggt aagaatgggt tcaaataaat caggtcgtag gtaaccatgc acttgatgt 360
 gtcaaatgag aagtaaaatt ttgtcactat accattgac atttatgtgt tgtaaaaaaa 420
 aattgttcct tttagcattg cacttgacac aaaactcagt ttcatgtcga attcaaactt 480
 gttattttct gtctgacaaa 500

<210> 14
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 14

gaaaactagt ggtttattta ctatatgtta ttgtatcttt caataaagag atgctccatt 60
 tgaccaaaaa taaaaagaga tgctccagat agtgcactt atctatgtta taataatcaa 120
 gtgtatgcat ttctttcccc tttatttgga gcatgtgtat gtttaaatat ttgtaatttg 180
 aaccttcaaa cttgttctag ttaccaaata ataagatcat tattagtttg tgtgtttatc 240
 tctattgtct actaatttta tttttttttt acttttctat tctttatttg tattaatatca 300

taagttctaa ttatttaatc aaaacttcaa atggtggcgg ttatacgcta ttccgaatcg 360
 tcttttggtg tccgagtcta taggtacac tcatatcctg gttgaaacag actctatagc 420
 tgtcctgatc aggtcaatca gattagaaga ttcttttctc aaaattggag tcttttcttt 480
 caacgctgtg cagattgact 500

<210> 15
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 15

aaaggttgaa ggaaagagaa tctcagcagt catattgaat ctgtttgatt tactacacaa 60
 aaggataatt ttctattttg gatgtttcaa taactgtgtg caatatttag gtatttagta 120
 tgctctgtga gcaaattaat ccccccctcc aaaatttcat ttcacccac ttttctgttt 180
 ttccaaatgt ctctgtatcc gtggctctgc cacaatcttt attgatattg caattttcca 240
 gttttgtgca aataatcatg agcatttcaa ttcactattt tcaaattgcgg ctttatacct 300
 taaacacgag ggcatagctt cacactatgg tttccatgaa tattgtcaca ccgtgggttg 360
 caaggatatt gtttaaagggt taaatgtgac tgtgaatgat caatattttg cagaaaagaa 420
 ataaacttaa acaaaagggt atctaaattt tcaatgacca gtaatcaata tcttacaatc 480
 tctcaactgt gaaattccga 500

<210> 16
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 16

tttgctttat atatgataag aaattgtttt tttagttttg ctttccattt gtaaaattat 60
 cttttgagag tttttagatt attgcacttt ctaaattttc attttgcttc tttgttggt 120
 ctgggatttc tgaaatgaac attagagtaa taaatcgaat ctgagtatta caagcaagtt 180
 tgttgaaata atgatctcta attttgtcaa gttaaagaaa tcaaaatata ttgtaccaa 240
 aaaaaaaaaa aatcaaaaca tcatgtttga ttaacaaaac tccaatttga aatcaattta 300

aatttaaatt tcatttttag aaagaaaaaa aaaatattat tccatccatt attagttctc 360
 gatttcacac aactagtttt tcgatttact cacgtacctt catatgagta tgtaagggtt 420
 gattacgtat tcattattgc tctttgtttc acataattct tttttttcaa tcaaaatgaa 480
 aattatataa aggagtacaa 500

<210> 17
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 17

aaatgaatga atcagctttc tcttggtcat aaagaattgt gtggaaatga attgtgtgtt 60
 gctatataca tgagtgtgtt gggtgctgcc ttatgtgttc ttctagggtt attttttctt 120
 ttgctttgta ataatttgtg cgttactatt gtaaacaatg tatttaatga ataatgaaag 180
 tctaaagttt gtaatggagg gaagtaaag taaatccttt cgcaagtgtt tttttagctt 240
 gaaagtcttt catgcattgg tttggagtac catcatatca cccttaattt ttctagttat 300
 gatttttaggg acaagagaag ttcaaattac actccaatta tgtgctcggg gaaatttaat 360
 tggtagcaga caatacacga aaaagtaaca catttagtat ctactatca tctgcaaadc 420
 gtgcatatgt tcatatcatt tcacattttt ataatccagc atattataaa ttcaaaccct 480
 attttggtac ataatagtat 500

<210> 18
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 18

ttaatccatc atcatcggca tgtgtgtttg tttttttgt gtctattttg accaaatcat 60
 atattcatat gtatgtgtaa attattatga actactgtat gttagtgtt catgttcgtg 120
 aactgaacac attgaatggc ctgtggagtg tggagattct ttcattgtgt tatttattat 180
 gagtttttct tttttatttc ttcaaaagca gactactgaa atattgattt gataccacca 240
 aaaagaaaaa gtaatatatc ttactattaa tatttatagt tgatataaac atcatcaaaa 300

tttaaaatca gtttctaatac ttggtttggt cgggggtggcc ctgggattcc attttgcata 360
 tgctgttgcc caggaactaa gctctttcat aagataatgt tcggggtagc tctgttacta 420
 ggtcataaaa aagaccgatt gttgtcatcg ttcgaaaaag cgaaaaaaca aacacaagca 480
 ttctcgtcat aacaaagacc 500

<210> 19
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 19

tgaagaagga taatgattga ttaattgttt aatataaagt tgaggggaatt tttttatatt 60
 ttctataaat tatcaaaata tgttgattgt tgagaataag aattctaggt tcaaaacaga 120
 atcttgaatt gtcaaggagt ctgttaaagt tgagatttat tattatgttt catttcaaaa 180
 gtattaagtt ttatttgtgt gactatttgg attgtgatta ttgctaaatg tttatacgta 240
 ttaaaatttg catgcttttt gtcccactca aataaaaatt aattagtatt gcttgcttcc 300
 aagttttaga tttactataa tatgtatttt ttttttttag agatacatgt aatatgtata 360
 aatattttgt aacgagcaaa aaaaatacac tctaattatc tcataataga gaaaagacac 420
 tctttatgtg agtgtaaatt cctataaaga aaagagatgt gaaaactacc ctcagtatac 480
 ggataattgc actcacaata 500

<210> 20
 <211> 289
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 20

gggctcttagt ttacttttct tgatttgtaa tgtacaatgg ggctgtggtg tttatatattc 60
 atttaaatcgt taatgtacta ctttatacta gttgtttata tttaaaaaag cataaacttt 120
 gcctcatcta aatgtacttg aattgagttt acttagaagt gcttgaattg agtttgtgta 180
 aatgaacata attttagtag tgcttagatt aagttcacat atcactactt tataaccaggg 240
 gattactatt ctttttagct tttgttttta ctgttggttt tttgccaaa 289

<210> 21
 <211> 382
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 21

```
gaaggggtctt gatctatgaa gcacggaaac gcctccgatt aggcgtgtcc aggtgtccga 60
cacgtatcat ctctgatacc gacacgacac cgacacttac aattacacgg aattatgtaa 120
ttttctcaaa ttattagagg tgtcggcgtg tcagtgtacg tgtcgtgtcc tttgtatccg 180
tgtttcatag gtcttggttc atttttcttg atttgtaatg tacaatgggg ttgttgtgtt 240
taaatttcat ctaatcttta ctgtactatt ataaatatat atactagttt gttcataaaa 300
gcataaagtt ttgcttatct ctttggtggt accgggtcaa tgctcgacct aggaaaaaat 360
taataaaatt tcattcataa aa 382
```

<210> 22
 <211> 400
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 22

```
gcaaggagga tcatgaacat cacaaagtga atttatttta tgtttgcacc atatattatt 60
atttgtgaca catttttagaa ctcttaaacc atttttctgt ttgcatttta gctactgggt 120
gttgatttca caataatgat gcagtcctat gcttcttggt gtaagattca atactatgta 180
aagtgtatgt ctttggttgt atactattta aaatctattc ttgtattgta taatttattt 240
tagcctttgt ttgagattga gggtacttgt tctgttgcac ttaatcacia gttttcattt 300
tgttatacgt acgtgttata ccctgttttt ggacctaaaa atactgggcc caatttcatt 360
tcaaactttg tcaattatca aatttcaact gcacagttca 400
```

<210> 23
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 23

actgcagtca cagtcataaa taccggtgca taacatgaat taattttata ttgcaacat 60
gtttttaaaa tcttaaacct tctatttttc cactccatag gttatcaatt aagtattatt 120
attttgtgtg attctactac ttggaatat aagaagattg aaaaggaatt tctgtgagcc 180
ctatatataa accctaaacc ctatgtttat tgcctattgg taccactgt actttgcggc 240
tgttgtgaag atcaagttat aattgctagg atagtttcta ttgggttcat gttagttttc 300
aaciaagtga tttcaattat gttgtttgaa cactttaaac tagttattgg ttgttgtatt 360
cacaataatg atgtagttct atgcttcttg gtgcatgaac aaatactaca taaagtgtaa 420
gcccttggtt gtaattgtat tttaggaaat atttactatt ttgtaattga ttttagcctt 480
tgtttgagat tgagataaca tgtatttact ttcctttctc attttatcac aattcttcat 540
ctttttttac attttggttt tatgaagagg actaaaaata tctctagtta ctttaacttct 600
cttttgtagt aagaaaaata ctatgatcag aaacataaat caagcatctg ttacgaacgg 660
tatacttgga aaaacaatat cattattaac aacttttagt 699

<210> 24
<211> 500
<212> ADN
<213> Medicago truncatula

<400> 24

aaacaccaat tccatcttct tcaataataa ccactatata tatatagaag caacttcaaa 60
aatacttaat acttgtatta taaattgagt tactttgaat gtcctacgat agagacggag 120
ttcaaacttc ctcaagtatg gttgaaaaat ggtcttcaat gtaactttaa ataaaaactt 180
tgtacgtcct cgctaataaa aataatgttt gtttaattac ttatatatg tatttttttaa 240
tgctatttta tatatgttgt accccaaact tgtctgacca atttaatcag aagaacatgt 300
agagtgtagg tttgccggga agatttgat taaagtcttc gtttggttgg gtttggtctt 360
ggtcatgccg gaaaatttat tttccttgta cttcaaatgt tttgcttttt cgatcggaaa 420
gggaatagga gattaaagg cctcctttta atatggcaaa cagaattata gcttttagact 480
gacgctgcgg tttagcttca 500

<210> 25
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 25

```

ttatggtagt agttttgaaa tgttggaac ttgtttttca tgttttgta ccatctgttt 60
taaactatgt actgtctcca tctgacattt taataactcg atcctcgggt tatttttagtt 120
ttcctattta ttactgcagt acttttggtt caattttgat ttagttgttt ccattatact 180
tccaattttg gtgttttatt cttttttctt aaaattttga tttatttata cttccgcata 240
gtgttttttt tacattgcga ttctatttaa attattatgt ttttcattta ggtttacaat 300
tttggttttag ttgttcccat aatattttca ttgttttagtt gttcgcatag tgttttttac 360
atttatgttt ttcatttcct aaattaaatt gttaatttga gatgatgctt ttttgtgaac 420
aatgaaaaca ttcttgatat tttcattggt tcaatgtctt gtataaatat tttcacatgt 480
tagaattttt atgttggttg 500

```

<210> 26
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 26

```

gagtactctc caacatggac acaccatggg attgtgtaac ataaataatg tgtcgtttgt 60
aatgaatgct cgcaactttt ctagctaatt aagctagagt tgaacttgag ctacttttat 120
gtaccctaaa gaggcacaat ctttgctggt gatgtactat gatcatgtta taatatgatg 180
aaaatggagt gtgcctcatt ttataatttt tattttcctg agtatatggt tttagggcta 240
aacaccttat aaaaaaagggt cacttagaat atgaaacatg aacttttgta aaaaagtaga 300
gattaaaatt gaaatcaaaa atttttatag gatcaatatt cgaagaattt ttttagaggg 360
attaaaatta aatatagttt cggactgacc caaggcacia tccggctccg ctcggttctg 420
acctgagtcc accatgcac tgtcacctta ccattgacac gccctaaaat acattagatc 480
gcagtacaaa ttgagagtta 500

```

<210> 27
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 27

```

caaattgtta gtgtttttct gatttagttc agagattgta agtaagatac cccaaaagtt   60
gtattatact atactattat agttagtaaa gcaatgtaat aactgtgcag gatgtcaaaa  120
gaaaagctag aaaaaatgat ttaaggggat atccggatat gagattgagt ccataggagc  180
accacattc atgccacca aatgagtggg ataaatggga cccacataat atattatatt  240
actttatact ttccaattat ttaaaccact caactacatt ttctaaatat ccataccact  300
cctctaaaac tctaaaatgg gtcccactta tcttacaact acaatatact ttaaattata  360
ttttaaatta atatataaaa tgtgtaatga aaatatataa aatgtatcac acaatatact  420
caaatgaat caaatatata tgttaaaaaa attagccggt gcatgagtga aaaaaaaaaa  480
atattaccgt tgcattgagt                                     500

```

<210> 28
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<400> 28

```

tgaagaagga taatgattga ttaattgttt aatataaagt tgagggaatt tttttatatt   60
ttctataaat tatcaaaata tgttgattgt tgagaataag aattctaggt tcaaaacaga  120
atcttgaatt gtcaaggagt ctgttaaatt tgagatttat tattatgttt catttcaaaa  180
gtattaagtt ttatttgtgt gactatttgg attgtgatta ttgctaaatg tttatacgta  240
ttaaaatttg catgcttttt gtcccactca aataaaaatt aattagtatt gcttgcttcc  300
aagttttaga tttactataa tatgtatttt ttttttttag agatacatgt aatatgtata  360
aatattttgt aacgagcaaa aaaaatacac tctaattatc tcataataga gaaaagacac  420
tctttatgtg agtgtaaatt cctataaaga aaagagatgt gaaaactacc ctcaagtatac  480
ggataattgc actcacaata                                     500

```

<210> 29
 <211> 481
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 29

```
gcagctggaa acttactagt gttaaagttg tatctggctc atttcgagct gggatatatat 60
atatgtgatt gtggaatttc ttgtgggtctg gaagtatatt caacagttgt gatgcagtat 120
tatggaattt atgacatgcg gtattatgga atttatgaca ttatgtggtg tttgcttcaa 180
taatatgtat caaaggagtt ttataagact tcatttaaca tttcagatgc ttggatgtgt 240
tactttatgt ttaccgtgct atgtttttat accagattca agattttaga tgccttaggc 300
ttggaacaag ttttgattgt ttaacaatta aaaaggtttt atgacctaaa accatggatt 360
ttcctgattt ccgaaagttt taaaattatt tcaaataaaa tcatggatgt tggtttaagt 420
ggcgaagtct tctgctcttt cttttcaagt agagtaagat cttggattct agtcaccatg 480
a 481
```

<210> 30
 <211> 600
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 30

```
tcattcaatt tgaccctttt gctacattct tgctgtcata gttatttaaat ttaatttctt 60
aaggtgcata ttcttttggg gaatttaagc cccccgaaa catggaagga ggttggctgc 120
aaagttcctg aaggataatc gtttttttca ttccctttaa tttttgttat tcattatttc 180
acattttacc taaaacttca gggagtgaga taaagaactc tttctctctg aactgtttat 240
gttgtctact agaaaaaaaa atcctgtaag aggtaaggta ttcttccaaa acaggattct 300
ttttcttata attttacttc attagtttct aagttccttt tcctacattg tataagattc 360
tgtcagtaca tttatgttgc ttatgtagga agtgggactg agtttcttat gaaggaattt 420
atgagttatt gaatatttat tgcaagctat attttagaat acagtatact ttcttcttat 480
gttattattt ttttaagtgt attgtgttgt gttattatta taagctttgt taaactctga 540
tcattttcaa attcaaaaca atgttttagtt caaaggcaaa gctgagttgt gctgattatt 600
```

<210> 31
 <211> 1594
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 31

```

actgttaata atttttaaac gtcagcgcac taaaaaacg aaaagacgga cacgtgaaaa 60
taaaaaacac acactagttt atgacgcaat actattttac ttatgatttg ggtacattag 120
acaaaaccgt gaaagagatg tatcagctat gaaacctgta tacttcaata cagagacgta 180
ctcatatcgg atacgtacgc acgaagtatc atattaatta ttttaatttt taataaatat 240
tttatcggat acttatgtga tactctacat atacacaagg atatttctaa gatactttat 300
agatacgtat cctagaaaaa catgaagagt aaaaaagtga gacaatgttg taaaaattca 360
ttataaatgt atatgattca attttagata tgcatacagta taattgattc tcgatgaaac 420
acttaaaatt atatttcttg tggaagaacg tagcgagaga ggtgattcag ttagacaaca 480
ttaaataaaa ttaatgttaa gttcttttaa tgatgtttct ctcaatatca catcatatga 540
aaatgtaata tgatttataa gaaaattttt aaaaaattta ttttaataat cacatgtact 600
attttttaaa aattgtatct tttataataa tacaataata aagagtaatc agtgtttaatt 660
tttcttcaaa tataagtttt attataaatc attgttaacg tatcataagt cattaccgta 720
tcgtatctta attttttttt aaaaaccgct aattcacgta cccgtatttg attgtacccg 780
cacctgtatc acaatcgatc ttagttagaa gaattgtctc gaggcggtgc aagacagcat 840
ataatagacg tggactctct tataccaaac gttgtcgtat cacaagggt taggtaacaa 900
gtcacagttt gtccacgtgt cacgttttaa ttggaagagc tgccgttggc gtaatataac 960
agccaatcga tttttgctat aaaagcaaact caggtaaact aaacttcttc attcttttct 1020
tccccatcgc taaaaaacg gttccttttg aaaagagatt cattcaaacc tagcacccaa 1080
ttccgtttca aggtataatc tactttctat tcttcgatta ttttattatt attagctact 1140
atcgtttaat cgatcttttc ttttgatccg tcaaatttaa attcaattag ggttttgttc 1200
ttttctttca tctgattgaa atccttctga attgaaccgt ttacttgatt ttactgttta 1260
ttgtatgatt taatcctttg tttttcaaag acagtcttta gattgtgatt aggggttcat 1320

```

ataaattttt agatttggat ttttgtattg tatgattcaa aaaatacgtc ctttaattag 1380
 attagtacat ggatattttt tacccgattt attgattgtc agggagaatt tgatgagcaa 1440
 gtttttttga tgtctgttgt aaattgaatt gattataatt gctgatctgc tgcttccagt 1500
 tttcataacc catattcttt taaccttggt gtacacacaa tgaaaaattg gtgattgatt 1560
 catttgtttt tctttgtttt ggattataca gggt 1594

<210> 32
 <211> 1000
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 32

actgttaata atttttaaac gtcagcgcac taaaaaacg aaaagacgga cacgtgaaaa 60
 taaaaaacac acactagttt atgacgcaat actattttac ttatgatttg ggtacattag 120
 acaaaaccgt gaaagagatg tatcagctat gaaacctgta tacttcaata cagagacgta 180
 ctcatatcgg atacgtacgc acgaagtatc atattaatta ttttaatttt taataaatat 240
 tttatcggat acttatgtga tactctacat atacacaagg atatttctaa gatactttat 300
 agatacgtat cctagaaaaa catgaagagt aaaaaagtga gacaatgttg taaaaattca 360
 ttataaatgt atatgattca attttagata tgcacagta taattgattc tcgatgaaac 420
 acttaaaatt atatttcttg tggaagaacg tagcgagaga ggtgattcag ttagacaaca 480
 ttaaataaaa ttaatgttaa gttcttttaa tgatgtttct ctcaatatca catcatatga 540
 aaatgtaata tgatttataa gaaaattttt aaaaaattta ttttaataat cacatgtact 600
 attttttaaa aattgtatct tttataataa tacaataata aagagtaatc agtggttaatt 660
 tttcttcaaa tataagtttt attataaatc attgttaacg tatcataagt cattaccgta 720
 tcgtatctta attttttttt aaaaaccgct aattcacgta cccgtattgt attgtaccg 780
 cacctgtatc acaatcgatc ttagttagaa gaattgtctc gaggcggtgc aagacagcat 840
 ataatagacg tggactctct tataccaaac gttgtcgtat cacaaagggg taggtaacaa 900
 gtcacagttt gtccacgtgt cacgttttaa ttggaagagc tgccggtggc gtaatataac 960
 agccaatoga tttttgctat aaaagcaaat caggtaaact 1000

<210> 33
 <211> 92
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 33

aaacttcttc attcttttct tccccatcgc tacaaaaccg gttcctttgg aaaagagatt 60
 cattcaaacc tagcacccaa ttccgtttca ag 92

<210> 34
 <211> 502
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 34

gtataatcta ctttctattc ttcgattatt ttattattat tagctactat cgtttaatcg 60
 atcttttctt ttgatccgtc aaattttaat tcaattaggg ttttgttctt ttctttcatc 120
 tgattgaaat ctttctgaat tgaaccgttt acttgatttt actgtttatt gtatgattta 180
 atcctttggt tttcaaagac agtcctttaga ttgtgattag gggttcatat aaatttttag 240
 atttggtatt ttgtattgta tgattcaaaa aatacgtcct ttaattagat tagtacatgg 300
 atatttttta cccgatttat tgattgtcag ggagaatttg atgagcaagt ttttttgatg 360
 tctgttgtaa attgaattga ttataattgc tgatctgctg cttccagttt tcataaccca 420
 tattctttta accttggtgt acacacaatg aaaaattggg gattgattca tttgtttttc 480
 tttgttttgg attatacagg gt 502

<210> 35
 <211> 1141
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 35

tggattaatt tatttggtact ggtttcgtaa tgagttgtat tcaatcattc tcttctttac 60
 aattttgggt gaaagtgggtc attgtatttt cttaaataac ttttttgctt atataaaaag 120
 agagagaaaa aaagatcggt tattgtctct actttgatta tagaatagaa gtttaagact 180

taatcaaacg ttataaaata ataaagatag taagtcttgc aaataaaata aaaaatgaga 240
 gtgctgataa agccaaaacc ttacacaaat tgagggatta aaaagttact cacgtctatg 300
 cataatcata cttacactca atattctcca ccaatgataa aatttgagga gttacttcaa 360
 ctttagaaat taattttttt ttttgacaag actttagaaa ttaattatta tatattgagt 420
 gtaatatgga ttaatcatat actaattcat tatatgcgtg actagtcaaa caagataaac 480
 ctggatggta attgattgta atgcaccacc aacattgaat taaaaattag caagtttttt 540
 tttgttgga aaaaattaaca agttaataac caaaatgtga ttttaattttt ttaatacgca 600
 aattttaatg gttaatctgt taggaggaaa aattgtgaat tttttagtgc ataaatcaaa 660
 ccgttgacct ttttattgaa ctcgtttagt ctcaactcat atcattggac tctaccttcg 720
 agaatgtacc aaaatgtggt tagttagacc tagcagggcc acataaatga actcgaacat 780
 acttttcttg aaaaattggt cttctcccat ttaaaattgc tcaactcctt gatctatcgg 840
 gagttaactc atactcggca ttattcaacg gtagctaacc cacattgtca ctgtagatt 900
 agttcaatca ttttttaaat cgagtcaacc aatcttaaaa gtctcagcat gagttaacta 960
 ccgctgaaaa atgtcgagcc cgagttaact tcacttgaat caagggaatg aacaatttta 1020
 aaaggagaaa aagcaatttt ccttttcttg aactcattaa gggtccaaat tcttttataa 1080
 aagggccact aactgcttt catatataca ccattcatal atagaaacca atagccaaaa 1140
 a 1141

<210> 36
 <211> 1107
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 36

tggattaatt tatttgact gggttcgtaa tgagttgtat tcaatcattc tcttctttac 60
 aattttgggt gaaagtgggtc attgtatttt cttaaataac ttttttgctt atataaaaag 120
 agagagaaaa aaagatcggt tattgtctct actttgatta tagaatagaa gtttaagact 180
 taatcaaacg ttataaaata ataaagatag taagtcttgc aaataaaata aaaaatgaga 240
 gtgctgataa agccaaaacc ttacacaaat tgagggatta aaaagttact cacgtctatg 300

cataatcata cttacactca atattctcca ccaatgataa aatttgagga gttacttcaa 360
 ctttagaaat taattttttt ttttgacaag acttttagaaa ttaattatta tatattgagt 420
 gtaatatgga ttaatcatat actaattcat tatatgcgtg actagtcaaa caagataaac 480
 ctggatggta attgattgta atgcaccacc aacattgaat taaaaattag caagtttttt 540
 tttgttgga aaaattaaca agttaataac caaaatgtga ttttaattttt ttaatacgca 600
 aattttaatg gttaatctgt taggaggaaa aattgtgaat ttttttagtgc ataaatcaaa 660
 ccgttgacct ttttattgaa ctcgtttagt ctcaactcat atcattggac tctaccttcg 720
 agaatgtacc aaaatgtggt tagtttagacc tagcagggcc acataaatga actcgaacat 780
 acttttcttg aaaaattggt cttctcccat ttaaaattgc tcactccttt gatctatcgg 840
 gagttaactc atactcggca ttattcaacg gtagctaacc cacattgtca ctgtagatt 900
 agttcaatca ttttttaa at cgagtcaacc aatcttaaaa gtctcagcat gagttaacta 960
 ccgctgaaaa atgtcgagcc cgagttaact tcacttgaat caagggaatg aacaatttta 1020
 aaaggagaaa aagcaatttt ctttttcttg aactcattaa gggtccaaat tcttttataa 1080
 aagggccact aactgcttt catatat 1107

<210> 37
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Medicago truncatula

<400> 37

acaccattca tacatagaaa ccaatagcca aaaa 34

<210> 38
 <211> 298
 <212> ADN
 <213> Gossypium hirsutum

<400> 38

tgtcgtacag tatttctaca tttgatgtgt gatttgtgaa gaacatcaaa caaaacaagc 60
 actggcttta atatgatgat aagtattatg gtaattaatt aattggcaaa aacaacaatg 120
 aagctaaaat tttatttatt gagccttgcg gttactttct tgtgatgatc ttttttattt 180

tctaattata tatagtttcc ttcgctttga aatgctaaag gtttgagaga gttatgttct 240
 ttttctcttc ctctttcttt tttaacttta tcaaacaatt tttgaataaa aatgtgag 298

<210> 39
 <211> 436
 <212> ADN
 <213> *Gossypium barbadense*

<400> 39

aacaaaagag tgcctcacat ttgatgcaat agctctgtaa tgtttcattc atttgcttat 60
 ttcggccttg tttttctcgt attctatggg ctgatgtctc atatgggact tttctactag 120
 agagcctacg ttactttacc atttatattgt attctttgag acattattat tattttttta 180
 ccttttgagg acactctttt tttgtatttg aaggaattta ttgtttattht tgtttggaat 240
 atgtttgggt ggattttattc gattcatata tattatataa aagtaattat gttattaaga 300
 aacgtagtaa gaacttacia atataaggat cgaatcccga acttcatgca aatcaattta 360
 caaccacac aagtttaaca tttaaattaac gtgattgggt agtaaattca tgtttctctg 420
 tttaatttgt tgaatt 436

<210> 40
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Gossypium barbadense*

<400> 40

tgatcacctg tcgtacagta tttctacatt tgatgtgtga tttgtgaaga acatcaaaca 60
 aaacaagcac tggctttaat atgatgataa gtattatgggt aattaattaa ttggcaaaaa 120
 caacaatgaa gctaaaattt tatttattga gccttgcggt taatttcttg tgatgatctt 180
 tttttttatt ttctaattat atatagtttc ctttgctttg aaatgctaaa ggtttgagag 240
 agttatgctc ttttttctt cctctttctt tttaacttt atcatacaaa ttttgaataa 300
 aaatgtgagt acatt 315

<210> 41
 <211> 315

<212> ADN
 <213> *Gossypium barbadense*

<400> 41

```
accatatgac actggtgcat gtgccatcat catgcagtaa tttcatggta tatcttaatt 60
atatggttaa taaaaaaaaag atggtgagtg aataatgtgc gtgcattcct ccatgcacca 120
atggtgaatc tctttgcata catagagatt ctgaatgatt atagtttatg ttgtagtgaa 180
attaattttg aatgttggtt tttaaatttta atgtcacttg gcttgattta tgttttaacg 240
aagcttatgt tatgtatttt actttaatga tattgcatgt attgttaatt taacattgct 300
tgatcagtat actct 315
```

<210> 42
 <211> 712
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(712)
 <223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã khảm hoặc EXP.

<400> 42

```
ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagag gaaggtgggt cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaata 360
ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
ctctgccgac agtggtccca aagatggacc cccacccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480
agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatatctcca ctgacgtaag 540
ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt 600
tcatttggag aggacactct agacagaaaa atttgctaca ttgtttcaca aacttcaaat 660
```

attattcatt tatttgtcag ctttcaaact ctttgtttct tgtttggtga tt 712

<210> 43
 <211> 613
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(613)
 <223> Trình tự khởi đầu 35S virus khảm súp lơ được tăng cường.

<400> 43

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagag gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
 agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
 aaacctctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtggaaga 360
 ggaaggtggc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
 ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480
 agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatctctcca ctgacgtaag 540
 ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt 600
 tcatttgagg agg 613

<210> 44
 <211> 2001
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(2001)
 <223> Trình tự mã hóa GUS E.coli tự nhiên với intron có thể xử lý.

<400> 44

atggtccgtc ctgtagaaac cccaaccogt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
 ttcagtctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcggt ggtgggaaag cgcgttacaa 120
 gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgata agttcgccga tgcagatat 180
 cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
 ggccagcgta tcgtgctgcg tttcgatgcg gtcactcatt acggcaaagt gtgggtcaat 300
 aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccg 360
 tatgttattg cggggaaaag tgtacgtaag tttctgcttc tacctttgat atatatataa 420
 taattatcat taattagtag taatataata tttaaataat ttttttcaaa ataaaagaat 480
 gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tatattttta tttataactt 540
 ttctaataata tgacaaaaat ttgttgatgt gcaggatatca cggtttgtgt gaacaacgaa 600
 ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
 cagtcttact tccatgatct ctttaactat gccggaatcc atcgacgagt aatgctctac 720
 accacgccga acacctgggt ggacgatata accgtggtga cgcattgctc gcaagactgt 780
 aaccacgcgt ctgttgactg gcagggtggtg gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt 840
 gatgcggatc aacagggtgt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggtg 900
 aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaaggt tatctctatg aactgtgcgt cacagccaaa 960
 agccagacag agtgtgatata ctaccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
 ggcgaacagt tcctgattaa ccacaaaccg ttctacttta ctggcttttg tcgtcatgaa 1080
 gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcacga ccacgcatta 1140
 atggactgga ttggggccaa ctctaccgt acctcgcat acccttacgc tgaagagatg 1200
 ctcgactggg cagatgaaca tggcatcgtg gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 1260
 aacctctctt taggcattgg tttcgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
 gaggcagtca acggggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
 cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440
 ccgcaagggt cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgacccg 1500
 acgcgtccga tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacaccga taccatcagc 1560

gatctcttttg atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat 1620
ttggaaacgg cagagaaggt actggaaaaa gaacttcttg cctggcagga gaaactgcat 1680
cagccgatta tcatcaccga atacggcgtg gatacgttag cggggctgca ctcaatgtac 1740
accgacatgt ggagtgaaga gtatcagtgt gcatggctgg atatgtatca ccgcgctctt 1800
gatcgcgtca gcgccgtcgt cgggtgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg 1860
caaggcatat tgcgcgttgg cggtaacaag aaagggatct tactcgcga ccgcaaaccg 1920
aagtcggcgg cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg 1980
cagcagggag gcaaacaatg a 2001

<210> 45
<211> 1653
<212> ADN
<213> *Photinus pyralis*
<400> 45

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaacaatt 120
gcttttacag atgcacatat cgaggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgtcgta 240
tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcggagtt 300
gcagttgcgc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
tcgcagccta ccgtagtggt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420
aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga 480
tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540
tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga 600
tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat ttttaagtgtt 720
gttccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780
cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840

```

aaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgcaa aagcactctg 900
attgacaaat acgattttatc taattttacac gaaattgctt ctggggggcgc acctctttcg 960
aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc caggggatacg acaaggatat 1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg aggggggatga taaaccgggc 1080
gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga taccgggaaa 1140
acgctgggcg ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt 1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct 1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgttaca 1380
cacccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt 1440
cccgccgccg ttgttggttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat 1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgctcg gaggagttgt gtttgtggac 1560
gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata 1620
aaggccaaga agggcggaag gtccaaattg taa 1653

```

```

<210>      46
<211>      936
<212>      ADN
<213>      Renilla reniformis

<400>      46

```

```

atggcttcca aggtgtacga ccccgagcaa cgcaaacgca tgatcactgg gcctcagtgg 60
tgggctcgct gcaagcaaat gaacgtgctg gactccttca tcaactacta tgattccgag 120
aagcacgccg agaacgccgt gatTTTTctg catggtaacg ctgcctccag ctacctgtgg 180
aggcacgtcg tgctcacat cgagcccgtg gctagatgca tcatccctga tctgatcgga 240
atgggtaagt ccggcaagag cgggaatggc tcatatcgcc tcttgatca ctacaagtac 300
ctcaccgctt ggttcgagct gctgaacctt ccaaagaaaa tcatctttgt gggccacgac 360
tggggggctt gtctggcctt tctactacc tacgagcacc aagacaagat caaggccatc 420
gtccatgctg agagtgtcgt ggacgtgatc gagtcctggg acgagtggcc tgacatcgag 480

```

gaggatatcg cctgatcaa gagcgaagag ggcgagaaaa tgggtgcttga gaataacttc 540
 ttcgtcgaga ccatgctccc aagcaagatc atgcggaaac tggagcctga ggagttcgct 600
 gcctacctgg agccattcaa ggagaagggc gaggttagac ggcctaccct ctcttggcct 660
 cgcgagatcc ctctcgtaa gggaggcaag cccgacgtcg tccagattgt ccgcaactac 720
 aacgcctacc ttcgggccag cgacgatctg cctaagatgt tcatcgagtc cgaccctggg 780
 ttcttttcca acgctattgt cgagggagct aagaagttcc ctaacaccga gttcgtgaag 840
 gtgaagggcc tccacttcag ccaggaggac gctccagatg aaatgggtaa gtacatcaag 900
 agcttcgtgg agcgcggtgct gaagaacgag cagtaa 936

<210> 47
 <211> 1446
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(1446)
 <223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã khảm hoặc EXP.

<400> 47

ggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
 ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120
 catcattgcg ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaaa 180
 gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca 240
 aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga 300
 aacctcctcg gattccattg ccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag 360
 gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
 tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
 gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
 gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt 600
 catttgagga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtagcgcg 660

tcactccgcc ctctgccttt gttactgcc aatgctctct tgtgtggtga 720
 ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcgtgtt ctgcctgtgc 780
 tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtac gaaacgaaga 840
 tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttggtg cttagcggta tttatttaag 900
 cacatgttgg tgttataggg cacttggatt cagaagtttg ctgttaattt aggcacaggc 960
 ttcatactac atgggtcaat agtataggga ttcataattat aggcgatact ataataattt 1020
 gttcgtctgc agagcttatt atttgccaaa attagatatt cctattctgt ttttgtttgt 1080
 gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgttta 1140
 tctctgctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg cacttgtttt aaatattgtt 1200
 gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgcttggt tgttgtaaca 1260
 aaatttaaaa ataaagagtt tcctttttgt tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320
 atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380
 cctagtgttg accagtgtta ctacacatag ctttgctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440
 aagcgg 1446

<210> 48
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(675)
 <223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã khảm hoặc EXP.

<400> 48

ggtccgatgt gagacttttc aacaaagggg aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
 cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg 120
 ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa 180
 agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
 aaagcaagtg gattgatgtg atgggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg 300

gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa 360
 aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg 420
 cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccacccac gaggagcatc gtggaaaaag 480
 aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa 540
 gggatgacgc acaatcccac tacccttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat 600
 ttcatttggg gaggaaccat cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg 660
 gacaacacac cataa 675

<210> 49
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> Agrobacterium tumefaciens

<400> 49

gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggTTTTtatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 50
 <211> 841
 <212> ADN
 <213> Glycine max

<400> 50

ggcaaaaaca tttaatacgt attatttaag aaaaaaatat gtaataatat atttatattt 60
 taatatctat tcttatgtat tttttaaaaa tctattatat attgatcaac taaaatattt 120
 ttatatctac acttatTTtg catttttatac aattttcttg cgTTTTtttg catatttaat 180
 aatgactatt ctttaataat caatcattat tcttacatgg tacatattgt tggaaccata 240
 tgaagtgtcc attgcatttg actatgtgga tagtgTTTTg atccaggcct ccatttgccg 300
 cttattaatt aatttggtaa cagtccgtac taatcagtta cttatccttc ctccatcata 360

attaatcttg gtagtctcga atgccacaac actgactagt ctcttggatc ataagaaaaa 420
 gccaaggaac aaaagaagac aaaacacaat gagagtatcc tttgcatagc aatgtctaag 480
 ttcataaaat tcaaacaaaa acgcaatcac acacagtgga catcacttat ccactagctg 540
 atcaggatcg ccgcgtaag aaaaaaaaaac tggaccccaa aagccatgca caacaacacg 600
 tactcacaaa ggtgtcaatc gagcagccca aaacattcac caactcaacc catcatgagc 660
 ccacacattt gttgtttcta acccaacctc aaactcgtat tctcttccgc cacctcattt 720
 ttgtttatth caacacccgt caaactgcat gccaccccggt ggccaaatgt ccatgcatgt 780
 taacaagacc tatgactata aatatctgca atctcggccc aggttttcat catcaagaac 840
 c 841

<210> 51
 <211> 422
 <212> ADN
 <213> Virut khảm cây thuộc dục

<400> 51

atcaacggag aaacaaagat aaaaatcaat tactcacatg aaagagtatt gatcacgagt 60
 cactatggag cgacaatctc cagacaggat gtcagcatct tatcttcctt tgaagaaagc 120
 atcatcaata acgatgtaat ggtggggaca tccactaagt tattgctctg caaacagctc 180
 aaaaagctac tggccgacaa tcataattgc tcggcatgtg caggtggggc ctccactagc 240
 aataatacaa gctttacagc ttgcagtgac tcctctcca ataatggaga aaaagacgctc 300
 agcagtgacg aacaagggtc gaaagacttg cctatataag ggcatctctc cctcagttga 360
 agatcatcga aagttggagc aataaactct ctcttcaaca aatctatctt ttatctttta 420
 tc 422

<210> 52
 <211> 595
 <212> ADN
 <213> Chủng virut Acuminata Vietnam gây bệnh vạch trên cây chuối

<400> 52

agacatcctg gaccaatatg ctgaagatta tgctacctac accaggatag gacttgaagc 60

acttaacctt gaagattggt tcgaagaacc agaaccgat ccacctaacc ctgtggaccg 120
 ccagaggata gaggacatcc tggacctact gaacgtcagc aatgacgact gaaagattcc 180
 caggacaccg gcggaagtgg tggacccagt ctaggtgcga tgcttagtcg cgcacgatga 240
 ctatgtcgga aggcattctt gctttcggca aacttttagta atactttaag gaaagtattg 300
 tacaagttag gtgcagagac aataatgcac ccagcttttag ctttggttat ggaattattg 360
 tgtcggttgc attattggat gcctgcgtgc accctaagca atccccggcc ctcttctcta 420
 taagaggagc ccttgcaatc agttgcaagc attcaagttt cccactgcaa gcttacttct 480
 gagtttgagt tcaagttcaa taaaattcaa gctttcctct tacattctgt tcttgaaagg 540
 ttcgatctaa tcgagcgagt agagaacaag atcttttggg atttccgccg ttcca 595

<210> 53
 <211> 382
 <212> ADN
 <213> Virut vòng ăn mòn cây cẩm chướng

<400> 53

atcctcaact tccaatcaga agttagcagc tgcaagcttt taggattcca tagtgataag 60
 atatgttctt atctaaacaa aaaagcaagc gtcggcaaac catacagctg tccacaaaaa 120
 ggaaaggctg taataacaag cggacccagc ttctcagtgg aagatacttt atcagacact 180
 gaataatgga tggaccctac cacgattaaa gaggagcgtc tgtctaaagt aaagtagatg 240
 cgtctttaat aattcatcta ctttagacgt catgcatgac gtttaacatg cattgtatcc 300
 agatcctccc tggctatata aagggagtta aatttcattg ttaaggcatc gaaaaaaaaa 360
 tttcaagtct atctctcaag aa 382

<210> 54
 <211> 1235
 <212> ADN
 <213> Cucumis melo

<400> 54

aaattttaat aattaaaatg aacaattttt caagagtaat agagtttgag agatgtcaga 60
 gaagtttgag gaagaagata acaagtggga gaagagaata agtttggtgt gtgaaagaga 120

```

aggggaaatt tcattcaagg gtatatggaa ctttttactc aaattttgta agtctatttt 180
ttccgatcaa tcctaaaatc acacacacccc ttaaaaaatg gattatatatt ggcaattttc 240
catgataaac tcattttttaa tttagagtta ttttttcaac gagatattaa cagtttttagt 300
tcataacta attgtaagaa tagtttcttt taagttgaat agaatttttg aaacttttaa 360
tagttcaaaa ggtatttttg aaacaaaata agaatgtttt tgaacttttt ataaaaagaa 420
ttgagatttt ttgaaattt ttgataaaga gaaaagaaaa gaagaaagaa aaaagaaaaa 480
caagtttgta gaactccgtg ggaaaatcgt cgagggccct gtgaaggaat ttgaaatta 540
taatgagggg attttcgtca acaagggaat ttagacatcg tatataagca tcctcaaacc 600
ctataattaa gcccttcaat ccaattgcc a ttctccatct ctgcccga gggtttaaga 660
gcagcttctc tcctcagggt ggggtttccc cctatcttct tcattcttcc tcttctcgat 720
ttctttcttc tatttgctcg atagtctctt atttcttgag cttttgctgt ttttctcctg 780
tacatcctaa catgaattat aacttggttt tgattttgtc ttttacttct gtattaaaca 840
acttttctta cccttttatt cttctcttct tcttcgtgtc cctgcccttt tgtttttatg 900
ctaattttat gtttctgttt atcaatctat cgaggcgtga cctgtcgttc ttccaatagc 960
gtagatctgc acttaatcta ttctagctga ttggattggg cgtttttcgt ttttttaatt 1020
tattttctct gttctagttc cgataaat ttttatatat aattaacaag ttctccagcc 1080
aaaagggtta atattgctgt ggatatttta atttttacgt tatttagatg tgtgaatcta 1140
ataaaattag ggttattcat aaatttcagt aatgatattt tggttatctg ttcttgctgt 1200
tcctgtttcg cagttctttt acctaattatt caagc 1235

```

<210> 55
 <211> 1865
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(1865)
 <223> Nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã khảm hoặc EXP.

<400> 55

aattctcagt ccaaagcctc aacaagggtca gggtagacagag tctccaaacc attagccaaa 60
agctacagga gatcaatgaa gaatcttcaa tcaaagtaaa ctactgttcc agcacatgca 120
tcatgggtcag taagtttcag aaaaagacat ccaccgaaga cttaaagtta gtgggcatct 180
ttgaaagtaa tcttgtcaac atcgagcagc tggcttgtgg ggaccagaca aaaaaggaat 240
gggtgcagaat tgtagggcg acctaccaa agcatctttg cctttattgc aaagataaag 300
cagattcctc tagtacaagt ggggaacaaa ataacgtgga aaagagctgt cctgacagcc 360
cactcactaa tgcgtatgac gaacgcagtg acgaccacaa aagaattagc ttgagctcag 420
gatttagcag cattccagat tgggttcaat caacaaggta cgagccatat cactttattc 480
aaattggtat cgccaaaacc aagaaggaac tcccatcctc aaaggtttgt aaggaagaat 540
tctcagtcca aagcctcaac aaggtcaggg tacagagtct ccaaaccatt agccaaaagc 600
tacaggagat caatgaagaa tcttcaatca aagtaaacta ctgttccagc acatgcatca 660
tggtcagtaa gtttcagaaa aagacatcca ccgaagactt aaagttagtg ggcattcttg 720
aaagtaatct tgtcaacatc gagcagctgg cttgtgggga ccagacaaaa aaggaatggg 780
gcagaattgt taggcgcacc taccaaaagc atctttgcct ttattgcaaa gataaagcag 840
attcctctag tacaagtggg gaacaaaata acgtggaaaa gagctgtcct gacagcccac 900
tcactaatgc gtatgacgaa cgcagtgacg accacaaaag aattccctct atataagaag 960
gcattcattc ccatttgaag gatcatcaga tacaaccatc ttccacacac tcaagccaca 1020
ctattggaga acacacaggg acaacacacc ataacggacc gaccgtcttc ggtacgcgct 1080
cactccgccc tctgcctttg ttactgccac gtttctctga atgctctctt gtgtgggtgat 1140
tgctgagagt ggttagctg gatctagaat tacactctga aatcgtgttc tgctgtgct 1200
gattacttgc cgtcctttgt agcagcaaaa tatagggaca tggtagtacg aaacgaagat 1260
agaacctaca cagcaatacg agaaatgtgt aatttgggtgc ttagcggtat ttatttaagc 1320
acatgttggg gttatagggc acttggaattc agaagtttgc tgtaatttta ggcacaggct 1380
tcatactaca tgggtcaata gtatagggat tcatattata ggcgatacta taataatttg 1440
ttcgtctgca gagcttatta ttgcaaaaa ttagatatc ctattctgtt tttgtttgtg 1500
tgctgttaaa ttgttaacgc ctgaaggaat aaatataaat gacgaaattt tgatgtttat 1560

ctctgctcct ttattgtgac cataagtcaa gatcagatgc acttggttta aatattgttg 1620
tctgaagaaa taagtactga cagtattttg atgcattgat ctgcttggtt gttgtaacaa 1680
aatttaaaaa taaagagttt cctttttggt gctctcctta cctcctgatg gtatctagta 1740
tctaccaact gacactatat tgcttctctt tacatacgta tcttgctcga tgccttctcc 1800
ctagtgttga ccagtgttac tcacatagtc tttgctcatt tcattgtaat gcagatacca 1860
agcgg 1865

<210> 56
<211> 300
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 56

attaatcgat cctccgatcc ctttaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60
tatatataaa ccctttcgca cgtacttata ctatgttttg tcatacatat atatgtgtcg 120
aacgatcgat ctatcactga tatgatatga ttgatccac agcctgatct ctgtatcttg 180
ttatttgtat accgtcaaat aaaagtttct tccacttggtg ttaataatta gctactctca 240
tctcatgaac cctatatata actagtttaa tttgctgtca attgaacatg atgatcgatg 300

<210> 57
<211> 892
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<400> 57

gttagctatg ttttttttcc ctttaaatatt ttaatgtatt tcttgtaata tttgtttgtg 60
tattgaagat tgaatcttga tgattgattg ttggtctgac tacagctggg ttttgtgtta 120
tgtaactatt tttaactatt ttggatagag gtctgtttga tgtgatgttc ttgattataa 180
aaataccatc ctactttggt atctcatatc tggttggaac atgagcaatt tcatttctcc 240
tagttcttga attaaaaacc tgaaagtatt gtgcaaaaag atgctaggaa tgagactatc 300
attgttttga tgcaatatgt tcttttaagt aataggtggt ttgtaagaag tctacgcagt 360
tctggatgta ttttactact cgggaaaact ggatagttgg atacttatta tgtataggaa 420

gtaaatgtgg ggattataat gcctttctct gccatctgct ctttgtatth tgtgtaaagc 480
ttggcatgcc tctcgtcaga tagccatcgc taccgtacat tcttttaaga atgaagcact 540
tagacacttg ctcgtttctg cctttgtcac attgaccag catcatataa tctgaaagat 600
tggttagcag ttggctgcta tttaacttgt atgttaaac aattgattth catgtgtatc 660
tcctcctth gtgctttgtg cttcttcata aaagaaaga aacatacatt cggttgtgct 720
ctctcctth ttcaatggta gagaggaaga acagataatt ttattgctgc tgtaggtatt 780
tgacatctgt gatattthca tagtaaggth ttgtttthc cttthtatt agttcaagat 840
tgthtcatga atttcataa gcgtaatacc atagthctth tatttgctac ag 892