



(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)



1-0047948

(51)^{2020.01} C12N 15/82; C12N 15/11; C12N 15/79; (13) B
A01H 5/10; C12N 15/29

(21) 1-2022-02610

(22) 18/01/2018

(62) 1-2019-04476

(86) PCT/US2018/014155 18/01/2018

(87) WO2018/136594 26/07/2018

(30) 62/448,019 19/01/2017 US

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/07/2022 412A

(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)

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

(72) DAVIS, Ian, W. (US); SHARIFF, Aabid (US).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP ĐIỀU BIẾN SỰ BIỂU HIỆN GEN Ở THỰC VẬT,
THỰC VẬT, TẾ BÀO THỰC VẬT, BỘ PHẬN THỰC VẬT VÀ HẠT GIỐNG
CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY

(21) 1-2022-02610

(57) Sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp và các cấu trúc, cũng như các trình tự nucleotit của chúng, hữu ích để điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật. Sáng chế còn đề xuất thực vật, tế bào thực vật, bộ phận của thực vật, và hạt giống chuyển gen bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp biểu hiện phân tử ADN này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử thực vật và thao tác di truyền thực vật. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến các phân tử ADN hữu ích để điều biến sự biểu hiện gen ở thực vật.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các yếu tố điều hòa là các yếu tố di truyền điều chỉnh hoạt động của gen bằng cách điều chỉnh quá trình phiên mã của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Các yếu tố như vậy có thể bao gồm các trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, intron và các vùng không dịch mã 3' và rất hữu ích trong lĩnh vực sinh học phân tử thực vật và thao tác di truyền thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các yếu tố điều hòa gen tổng hợp mới để sử dụng trong thực vật. Sáng chế cũng đề xuất các phân tử và cấu trúc ADN tái tổ hợp bao gồm các yếu tố điều hòa. Sáng chế cũng đề xuất các tế bào thực vật, thực vật và hạt giống chuyển gen bao gồm các yếu tố điều hòa tổng hợp. Theo một phương án, các yếu tố điều hòa tổng hợp được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng các yếu tố điều hòa tổng hợp và phương pháp sản xuất và sử dụng các phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm các yếu tố điều hòa tổng hợp và tế bào thực vật, thực vật và hạt giống chuyển gen bao gồm các yếu tố điều hòa tổng hợp có thể liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN được chọn từ nhóm bao gồm: (a) trình tự có mức đồng nhất trình tự ít nhất 85 phần trăm với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. “Phân tử ADN có thể phiên mã khác loại”, có nghĩa là phân tử ADN có thể phiên mã là khác loại đối với

trình tự polynucleotit mà nó được liên kết theo cách hoạt động. Theo các phương án cụ thể, phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN có mức đồng nhất 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 của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45. Theo các phương án cụ thể, trình tự ADN bao gồm yếu tố điều hòa. Theo một số phương án, yếu tố điều hòa bao gồm trình tự khởi đầu. Theo các phương án khác nữa, phân tử ADN có thể phiên mã khác loại bao gồm gen được quan tâm về nông học, như gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ ở thực vật, hoặc gen có khả năng kháng sâu bệnh ở thực vật. Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề xuất cấu trúc bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp như được đề xuất ở đây.

Theo một khía cạnh khác, được đề xuất ở đây là các tế bào thực vật chuyển gen bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có mức đồng nhất trình tự ít nhất 85 phần trăm với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự ADN được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. Theo một số phương án nhất định, tế bào thực vật chuyển gen là tế bào thực vật một lá mầm. Theo các phương án khác, tế bào thực vật chuyển gen là tế bào thực vật hai lá mầm.

Theo một khía cạnh khác nữa, được đề xuất ở đây là thực vật chuyển gen, hoặc bộ phận của nó, bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm: (a) trình tự có mức đồng nhất trình tự ít nhất 85 phần trăm với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45; (b) trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45; và (c) đoạn của trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1-29 và 43-45, trong đó đoạn này có hoạt tính điều hòa gen; trong đó trình tự được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. Theo các phương án cụ thể, thực vật chuyển gen là thực vật thế hệ sau của thế hệ bất kỳ mà bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp. Hạt giống chuyển gen bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp mà tạo ra thực vật chuyển gen khi được trồng cũng được đề xuất ở đây.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa bao gồm bước thu được thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của nó có 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 giống, hạt, các bộ phận thực vật, dầu và bột thô.

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

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự ADN của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa tổng hợp (EXP), EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP442.nno:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP442.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron (I-At.Cyco:2).

SEQ ID NO:2 là trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP442.nno:2.

SEQ ID NO:3 là trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP442.nno:1.

SEQ ID NO:4 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP571.nno:5), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP571.nno:1).

SEQ ID NO:5 là trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP571.nno:5.

SEQ ID NO:6 là trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP571.nno:1.

SEQ ID NO:7 là trình tự ADN của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa tổng hợp (EXP), EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP571.nno:5), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP571.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron (I-At.Cyco:2).

SEQ ID NO:8 là trình tự ADN của nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa tổng hợp (EXP), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP571.nno:5), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP571.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp (I-At.GSI21.nno:2).

SEQ ID NO:9 là trình tự intron tổng hợp, I-At.GSI21.nno:2.

SEQ ID NO:10 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP571.nno:5), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP571.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp (I-At.GSI102.nno:1).

SEQ ID NO:11 là trình tự intron tổng hợp, I-At.GSI102.nno:1.

SEQ ID NO:12 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP564.nno:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP564.nno:1).

SEQ ID NO:13 là trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP564.nno:3.

SEQ ID NO:14 là trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP564.nno:1.

SEQ ID NO:15 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP564.nno:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP564.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron (I-At.Cyco:2).

SEQ ID NO:16 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP564.nno:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP564.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp (I-At.GSI17.nno:1).

SEQ ID NO:17 là trình tự intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1.

SEQ ID NO:18 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP564.nno:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP564.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp (I-At.GSI102.nno:1).

SEQ ID NO:19 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP579.nno:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP579.nno:1).

SEQ ID NO:20 là trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP579.nno:2.

SEQ ID NO:21 là trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP579.nno:1.

SEQ ID NO:22 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP579.nno:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP579.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp (I-At.GSI102.nno:1).

SEQ ID NO:23 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 bao gồm trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp (P-At.GSP571/442, gồm trình tự tăng cường tổng hợp (E-At.GSP571.nno:1) được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP442.nno:2)), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP442.nno:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu (L-At.Cyco-1:1:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron (I-At.Cyco:2).

SEQ ID NO:24 là trình tự tăng cường tổng hợp, E-At.GSP571.nno:1.

SEQ ID NO:25 là trình tự ADN của trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp, P-At.GSP571/442 gồm trình tự tăng cường tổng hợp (E-At.GSP571.nno:1) được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP442.nno:2).

SEQ ID NO:26 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP576.nno:4), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP576.nno:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp (I-At.GSI17.nno:1).

SEQ ID NO:27 là trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP576.nno:4.

SEQ ID NO:28 là trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP576.nno:2.

SEQ ID NO:29 là 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1.

SEQ ID NO:30 là trình tự ADN của EXP tổng hợp, EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp (P-At.GSP221:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp (L-At.GSP221:1), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron (I-At.Cyco:2).

SEQ ID NO:31 là trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP221:3.

SEQ ID NO:32 là trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP221:1.

SEQ ID NO:33 là trình tự intron, I-At.Cyco:2 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Xytocrom c oxidaza từ *Arabidopsis*.

SEQ ID NO:34 là trình tự 3' UTR, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 thu được từ gen Sali3 của *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO:35 là trình tự 3' UTR, T-Mt.Oxr-1:2:1 thu được từ gen protein oxidoreductaza (OXR) giả định từ *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO:36 là trình tự 3' UTR, T-Gb.FbL2:1 thu được từ gen FbLate-2 *Gossypium barbadense*.

SEQ ID NO:37 là trình tự 3' UTR, T-Mt.RD22-1:2:1 thu được từ gen RD22 protein khử nước-đáp ứng từ *Medicago truncatula*.

SEQ ID NO:38 là trình tự ADN của EXP thu được từ gen VIa dưới đơn vị Xytocrom c oxidaza từ *Arabidopsis*, EXP-At.Cyco:1:1 bao gồm trình tự khởi đầu (P-At.Cyco-1:1:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu (L-At.Cyco-1:1:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron (I-At.Cyco-1:1:1).

SEQ ID NO:39 là trình tự khởi đầu, P-At.Cyco-1:1:2 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Xytocrom c oxidaza từ *Arabidopsis*.

SEQ ID NO:40 là trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Xytocrom c oxidaza từ *Arabidopsis*.

SEQ ID NO:41 là trình tự intron, I-At.Cyco-1:1:1 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Xytocrom c oxidaza từ *Arabidopsis*.

SEQ ID NO:42 là trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS) với intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng từ khoai tây (số truy cập Genbank: X04753).

SEQ ID NO:43 là trình tự ADN của EXP, EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP442.nno:2, được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP442.nno:1, được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2, mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco:2.

SEQ ID NO:44 là trình tự ADN của 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2.

SEQ ID NO:45 là trình tự ADN của EXP, EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1 bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP564.nno:3, được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP564.nno:1, mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco:2.

SEQ ID NO:46 là trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S bao gồm trình tự dẫn đầu và trình tự khởi đầu 35S thu được từ virus khảm súp lơ.

SEQ ID NO:47 là trình tự ADN của intron, I-Zm.DnaK:1, thu được từ gen protein 70 (Hsp70) sốc nhiệt (DnaK) từ *Zea mays*.

SEQ ID NO:48 là trình tự ADN của 3' UTR, T-Os.LTP:1, thu được từ gen giống protein vận chuyển lipid (LTP) từ *Oryza sativa*.

SEQ ID NO:49 là trình tự mã hóa đối với protein huỳnh quang luciferaza NanoLuc® (Promega, Madison, WI 53711), Nluc mà được thao tác di truyền bằng tiến hóa định hướng từ luciferaza tôm biển sâu (*Oplophorus gacilirostris*).

SEQ ID NO:50 là trình tự ADN của EXP, EXP-At.Bglu21+At.Cyco:2 bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu của gen beta-glucuronidaza 21 từ *Arabidopsis thaliana*, được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco-1:1:1.

SEQ ID NO:51 là trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 bao gồm trình tự khởi đầu 35S được tăng cường của virus khảm súp lơ, được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu của gen protein 70 sốc nhiệt (HSP70) từ *Petunia x hybrid*.

SEQ ID NO:52 là trình tự ADN của EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu của gen đầu tiên 7S alpha của đậu tương.

SEQ ID NO:53 là trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 bao gồm trình tự khởi đầu 35S được tăng cường của virus khảm súp lơ, được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-Zm.DnaK:1.

SEQ ID NO:54 là trình tự ADN mã hóa protein luciferaza (LUCIFERASE:1:3) thu được từ *Photinus pyralis* (đom đóm).

SEQ ID NO:55 là trình tự ADN của 3' UTR, T-AGRtu.nos-1:1:13 thu được từ gen *Agrobacterium tumefaciens* nopalin synthaza.

SEQ ID NO:56 là trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 bao gồm trình tự khởi đầu 35S được tăng cường của virus khảm súp lơ, được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu của gen liên kết chất diệp lục a/b của phức hợp tập hợp ánh sáng của *Triticum aestivum* (lúa mì).

SEQ ID NO:57 là trình tự ADN mã hóa protein luciferaza (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1) thu được từ *Renilla reniformis* (Sea Pansy).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các yếu tố điều hòa tổng hợp có hoạt tính điều hòa gen ở thực vật. Trình tự nucleotit của các yếu tố điều hòa tổng hợp này được đề xuất dưới dạng SEQ ID NO:1-32 và SEQ ID NO:43-45. Các yếu tố điều hòa tổng hợp này có khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động trong các mô thực vật, và do đó điều chỉnh sự biểu hiện gen của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động trong cây chuyển gen. Sáng chế cũng đề xuất các phương pháp cải biến, sản xuất và sử dụng các phân tử ADN tái tổ hợp có chứa các yếu tố điều hòa tổng hợp được đề xuất. Sáng chế cũng đề xuất các chế phẩm bao gồm các tế bào thực vật, thực vật, bộ phận của thực vật và hạt giống chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế, và các phương pháp để điều chế và sử dụng chúng.

Các định nghĩa và phương pháp sau đây được đề xuất để xác định rõ hơn sáng chế và hướng dẫn người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để thực hành sáng chế. Trừ khi có ghi chú khác, các thuật ngữ sẽ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực liên quan.

Các phân tử ADN

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ADN” hoặc “phân tử ADN” dùng để chỉ phân tử ADN sợi kép có nguồn gốc thuộc hệ gen hoặc tổng hợp, tức là polyme của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc phân tử ADN, được đọc từ đầu 5' (ngược dòng) đến đầu 3' (xuôi dòng). Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự ADN” đề cập đến trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng ở đây tương ứng với Tiêu đề 37 của Bộ luật các quy định liên bang Hoa Kỳ (the United States Code of Federal Regulations) § 1.822 và được nêu trong các bảng trong Tiêu chuẩn WIPO ST.25 (WIPO Standard ST.25) (1998), Phụ lục 2, Bảng 1 và 3.

Như được sử dụng ở đây, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN bao gồm sự kết hợp của các phân tử ADN mà không tồn tại trong tự nhiên cùng nhau mà không có sự can thiệp của con người. Ví dụ, phân tử ADN tái tổ hợp có thể là phân tử ADN bao gồm ít nhất hai phân tử ADN khác loại với nhau, phân tử ADN bao gồm trình tự ADN khác với trình tự ADN tồn tại trong tự nhiên, phân tử ADN bao gồm trình tự ADN tổng hợp hoặc phân tử ADN đã được tích hợp vào ADN của tế bào chủ bằng cách biến nạp gen hoặc chỉnh sửa gen.

Như được sử dụng ở đây, “trình tự nucleotit tổng hợp” hay “trình tự nucleotit nhân tạo” là trình tự nucleotit không được biết đến là tồn tại trong tự nhiên, tức là nó không tồn tại trong tự nhiên hoặc không tồn tại mà không có sự can thiệp của con người. Các yếu tố điều hòa gen theo sáng chế bao gồm các trình tự nucleotit tổng hợp. Tốt hơn là, các trình tự nucleotit tổng hợp chung nhau ít hoặc không có mức đồng nhất mở rộng với các trình tự tự nhiên. Mức tương đồng mở rộng trong bối cảnh này thường đề cập đến mức đồng nhất trình tự 100% kéo dài vượt quá khoảng 25 nucleotit của trình tự liên tục.

Trong đơn này, sự tham chiếu đến “phân tử ADN được phân lập”, hoặc thuật ngữ hoặc cụm từ tương đương, được dự định nghĩa là phân tử ADN chỉ tồn tại một mình hoặc kết hợp với các chế phẩm khác, nhưng không phải trong môi trường tự nhiên của nó. Ví dụ, các yếu tố axit nucleic như trình tự mã hóa, trình tự intron, trình tự dẫn đầu chưa được dịch mã, trình tự khởi đầu, trình tự kết thúc phiên mã, và tương tự, được tìm thấy trong tự nhiên trong ADN của bộ gen của sinh vật không được coi là “được phân lập” miễn là yếu tố này nằm trong bộ gen của sinh vật và tại vị trí trong bộ gen mà nó được tìm thấy trong tự nhiên. Tuy nhiên, mỗi yếu tố này, và các phần tử con của các yếu tố này sẽ là “được phân lập” trong phạm vi của phần mô tả này miễn là yếu tố đó không nằm trong bộ gen của sinh vật và tại vị trí trong bộ gen mà nó được tìm thấy trong tự nhiên. Theo một phương án, thuật ngữ “được phân lập” dùng để chỉ phân tử ADN được tách ra ít nhất một phần khỏi một số axit nucleic thường nằm bên sườn phân tử ADN ở trạng thái bẩm sinh hoặc tự nhiên của nó. Do đó, các phân tử ADN được dung hợp với các trình tự điều hòa hoặc mã hóa mà chúng không thường được liên kết cùng, ví dụ như là kết quả của các kỹ thuật tái tổ hợp, được coi là được phân lập trong tài liệu này. Các phân tử như vậy được coi là được phân lập khi được tích hợp vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc hiện diện trong dung dịch axit nucleic với các phân tử ADN khác, trong đó chúng không ở trạng thái tự nhiên. Đối với mục đích của phần mô tả này, trình tự nucleotit chuyển gen bất kỳ, tức là trình tự nucleotit

của ADN được cài xen vào bộ gen của các tế bào của thực vật hoặc vi khuẩn, hoặc hiện diện trong vectơ ngoài nhiễm sắc thể, sẽ được coi là trình tự nucleotit được phân lập dù cho nó có mặt trong plasmid hoặc cấu trúc tương tự được sử dụng để biến nạp các tế bào, trong bộ gen của thực vật hoặc vi khuẩn, hoặc hiện diện với số lượng có thể phát hiện được trong các mô, thể hệ sau, mẫu sinh học hoặc các sản phẩm hàng hóa thu được từ thực vật hoặc vi khuẩn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “mức đồng nhất trình tự” dùng để chỉ mức độ mà hai trình tự polynucleotit được sắp thẳng hàng tối ưu hoặc hai trình tự polypeptit được sắp thẳng hàng tối ưu là giống hệt nhau. 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 tham chiếu và trình tự khác, để tối đa hóa số lượng nucleotit phù hợp khi sắp thẳng hàng trình tự sự cài xen, xóa hoặc khoảng trống nucleotit bên trong thích hợp. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự tham chiếu” đề cập đến trình tự ADN được đề xuất dưới dạng SEQ ID NO: 1-32 và SEQ ID NO: 43-45.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phần trăm mức đồng nhất trình tự” hoặc “phần trăm mức đồng nhất” hoặc “% mức đồng nhất” là phần tương đồng được nhân với 100. “Phần đồng nhất” đối với trình tự được sắp thẳng hàng tối ưu với một trình tự tham chiếu là số lượng các nucleotit phù hợp khi sắp thẳng hàng tối ưu, chia cho tổng số nucleotit trong trình tự tham chiếu, ví dụ, tổng số nucleotit trong toàn bộ chiều dài của toàn bộ trình tự tham chiếu. Do đó, theo một phương án, sáng chế đề xuất phân tử ADN bao gồm trình tự mà khi được sắp thẳng hàng tối ưu với trình tự tham chiếu, được đề xuất ở đây ở dạng trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-32 và SEQ ID NO: 43-45, có mức đồng nhất ít nhất khoảng 85 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 86 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 87 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 88 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 89 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 90 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 91 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 92 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 93 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 94 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 95 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 96 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 97 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 98 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 99 phần trăm, tương đồng ít nhất khoảng 100 phần trăm so với trình tự tham chiếu. Theo các phương án cụ thể khác nữa, trình tự có phần trăm mức đồng nhất so với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-32 và SEQ ID NO: 43-45 có thể được định nghĩa là biểu hiện hoạt tính của trình tự khởi đầu được sở hữu bởi

trình tự bắt đầu mà nó bắt nguồn. Trình tự có phần trăm mức đồng nhất với trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO: 1-32 và SEQ ID NO: 43-45 có thể bao gồm thêm một “trình tự khởi đầu tối thiểu” mà cung cấp mức độ phiên mã cơ bản và bao gồm một hộp TATA hoặc trình tự tương đương để nhận biết và liên kết phức hợp ARN polymeraza II để bắt đầu phiên mã.

Các yếu tố điều hòa

Các yếu tố điều hòa như trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu (còn được gọi là 5' UTR), trình tự tăng cường, intron, và vùng chấm dứt phiên mã (hoặc 3' UTR) đóng một phần không thể thiếu trong biểu hiện tổng thể của gen trong tế bào sống. Thuật ngữ “yếu tố điều hòa”, như được sử dụng ở đây, có nghĩa là một phân tử ADN có hoạt tính điều hòa gen. Thuật ngữ “hoạt tính điều hòa gen”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến khả năng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của một phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động, ví dụ như bằng cách ảnh hưởng đến sự phiên mã và/hoặc dịch mã của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Các yếu tố điều hòa, như trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, trình tự tăng cường, intron, và 3' UTR hoạt động trong thực vật rất hữu ích để cải biến kiểu hình thực vật thông qua thao tác di truyền.

Như được sử dụng ở đây, “nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa” hoặc trình tự “EXP” có thể đề cập đến một nhóm các yếu tố điều hòa được liên kết theo cách hoạt động, như trình tự tăng cường, trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, và intron. Ví dụ, nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa có thể bao gồm, ví dụ, trình tự khởi đầu được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu. Các EXP hữu ích trong việc thực hành sáng chế bao gồm SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30, 43 và 45.

Các yếu tố điều hòa có thể được đặc trưng bởi kiểu biểu hiện gen của chúng, ví dụ, tác động tích cực và/hoặc tiêu cực như biểu hiện cấu trúc hoặc biểu hiện thời gian, không gian, phát triển, mô, môi trường, sinh lý, bệnh lý, chu kỳ tế bào và/hoặc biểu hiện đáp ứng về mặt hóa học, và sự kết hợp bất kỳ của chúng, cũng như bằng các chỉ dẫn định lượng hoặc định tính. Như được sử dụng ở đây, “kiểu biểu hiện gen” là kiểu phiên mã bất kỳ của phân tử ADN được liên kết theo cách hoạt động trong phân tử ARN được phiên mã. Phân tử ARN được phiên mã có thể được dịch mã để tạo ra phân tử protein hoặc có thể tạo ra đoạn đối nghĩa hoặc phân tử ARN điều hòa khác, như ARN sợi kép (dsARN), ARN vận chuyển (tARN), ARN ribosom (rARN), microARN (miARN), và các dạng tương tự

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biểu hiện protein” là kiểu dịch mã bất kỳ của phân tử ARN được phiên mã thành phân tử protein. Biểu hiện protein có thể được đặc trưng bởi các đặc tính thời gian, không gian, phát triển hoặc hình thái của nó, cũng như bởi các chỉ dẫn định lượng hoặc định tính.

Trình tự khởi đầu là hữu ích làm yếu tố điều hòa để điều chỉnh sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự khởi đầu”, thường chỉ phân tử ADN có liên quan đến sự nhận biết và liên kết của ARN polymeraza II và các protein khác, như các yếu tố phiên mã tác động kiểu trans, để bắt đầu phiên mã. Trình tự khởi đầu ban đầu có thể được phân lập từ vùng không dịch mã 5' (5' UTR) của một bản sao bộ gen của gen. Theo cách khác, trình tự khởi đầu có thể là các phân tử ADN được sản xuất tổng hợp hoặc được thao tác bằng tay. Trình tự khởi đầu cũng có thể là dạng khảm. Trình tự khởi đầu dạng khảm được tạo ra thông qua sự dung hợp của hai hoặc nhiều phân tử ADN khác loại. Trình tự khởi đầu hữu ích trong việc thực hành sáng chế bao gồm các yếu tố trình tự khởi đầu bao gồm trình tự bất kỳ trong số SEQ ID: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 và 39 hoặc các đoạn hoặc biến thể của chúng. Theo các phương án cụ thể của sáng chế, các phân tử ADN được yêu cầu bảo hộ và các biến thể hoặc dẫn xuất bất kỳ của chúng như được mô tả trong tài liệu này, được định nghĩa thêm là bao gồm hoạt động của trình tự khởi đầu, tức là có khả năng hoạt động như một trình tự khởi đầu trong tế bào chủ, như trong thực vật chuyển gen. Theo các phương án cụ thể khác nữa, một đoạn có thể được định nghĩa là biểu hiện hoạt động của trình khởi đầu được sở hữu bởi phân tử khởi đầu bắt đầu mà nó có nguồn gốc, hoặc một đoạn có thể bao gồm “trình tự khởi đầu tối thiểu” mà cung cấp mức độ phiên mã cơ bản và bao gồm một hộp TATA hoặc trình tự DNA tương đương để nhận biết và liên kết phức hợp ARN polymeraza II để bắt đầu phiên mã.

Theo một phương án, các đoạn của trình tự khởi đầu được mô tả ở đây được đề xuất. Các đoạn của trình tự khởi đầu có thể bao gồm hoạt động khởi đầu, như nêu trên, và có thể là hữu ích một mình hoặc kết hợp với trình tự khởi đầu khác và các đoạn của trình tự khởi đầu, như trình tự khởi đầu cấu trúc dạng khảm, hoặc kết hợp với các yếu tố biểu hiện khác và các đoạn của yếu tố biểu hiện. Theo các phương án cụ thể, các đoạn của trình tự khởi đầu được đề xuất bao gồm 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 liên tục, hoặc dài hơn, của phân tử ADN có hoạt động khởi đầu như được mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất các đoạn của trình tự khởi đầu được đề xuất ở đây, có hoạt động của trình tự có chiều dài đầy đủ. Các phương pháp sản xuất các đoạn như vậy từ phân tử trình tự khởi đầu bắt đầu là được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các chế phẩm thu được từ các yếu tố khởi đầu bất kỳ được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 và 39, như xóa bên trong hoặc 5', ví dụ, có thể được tạo bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để cải thiện hoặc thay đổi sự biểu hiện, bao gồm bằng cách loại bỏ các yếu tố có tác động tích cực hoặc tiêu cực đến sự biểu hiện; nhân đôi các yếu tố có tác động tích cực hoặc tiêu cực đến sự biểu hiện; và/hoặc nhân đôi hoặc loại bỏ các yếu tố có ảnh hưởng đặc hiệu mô hoặc tế bào đối với sự biểu hiện. Các chế phẩm thu được từ yếu tố khởi đầu bất kỳ được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 và 39 bao gồm xóa 3' trong đó phân tử hộp TATA hoặc trình tự tương đương của nó và trình tự xuôi dòng được loại bỏ có thể được sử dụng, ví dụ, để tạo ra các yếu tố tăng cường. Việc xóa thêm có thể được thực hiện để loại bỏ yếu tố bất kỳ có tác động tích cực hoặc tiêu cực; đặc hiệu mô; đặc hiệu tế bào; hoặc đặc hiệu thời gian (như, nhưng không giới hạn ở, nhịp sinh học) đối với sự biểu hiện. Các yếu tố khởi đầu bất kỳ được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:2, 5, 13, 20, 25, 27, 31 và 39 và các đoạn hoặc trình tự tăng cường có nguồn gốc từ đó có thể được sử dụng để tạo ra các chế phẩm yếu tố điều hòa phiên mã dạng khả.

Theo sáng chế, trình tự khởi đầu hoặc đoạn trình tự khởi đầu có thể được phân tích về sự hiện diện của các yếu tố khởi đầu đã biết, tức là, các đặc điểm trình tự ADN, như hộp TATA và các motif vị trí liên kết yếu tố phiên mã đã biết khác. Việc xác định các yếu tố khởi đầu đã biết như vậy có thể được sử dụng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để thiết kế các biến thể của trình tự khởi đầu có mẫu biểu hiện tương tự như trình khởi đầu ban đầu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự dẫn đầu” đề cập đến phân tử ADN được phân lập từ vùng 5' chưa được dịch mã (5' UTR) một gen và được định nghĩa chung là một đoạn nucleotit 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 tổng hợp hoặc được thao tác bằng tay. Trình tự dẫn đầu có thể được sử dụng như một yếu tố điều hòa 5' để điều

chính biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Các phân tử dẫn đầu có thể được sử dụng với trình tự khởi đầu khác loại hoặc với trình tự khởi đầu tự nhiên của chúng. Các trình tự dẫn đầu hữu ích trong việc thực hành sáng chế bao gồm SEQ ID NO:3, 6, 14, 21, 28, 32 và 40; hoặc yếu tố dẫn đầu bất kỳ được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30, 43 và 45 hoặc các đoạn hoặc các biến thể của chúng. Theo các phương án cụ thể, các trình tự ADN như vậy có thể được định nghĩa là có khả năng đóng vai trò là trình tự dẫn đầu trong một tế bào chủ, bao gồm, ví dụ, tế bào thực vật chuyển gen. Theo một phương án, các trình tự như vậy được giải mã ở dạng bao gồm hoạt động của trình tự dẫn đầu.

Các trình tự dẫn đầu (còn được gọi là 5' UTR) có mặt ở dạng SEQ ID NO:3, 6, 14, 21, 28, 32 và 40 hoặc yếu tố dẫn đầu bất kỳ được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30 và 43 có thể bao gồm các yếu tố điều hòa, hoặc có thể chấp nhận các cấu trúc thứ cấp mà có thể có tác động đối với sự phiên mã hoặc dịch mã của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Các trình tự dẫn đầu có mặt ở dạng SEQ ID NO:3, 6, 14, 21, 28, 32 và 40 hoặc yếu tố dẫn đầu bất kỳ được bao gồm trong trình tự bất kỳ trong số SEQ ID NO:1, 4, 7, 8, 10, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30, 43 và 45 có thể được sử dụng theo sáng chế để tạo ra các yếu tố điều hòa khả năng mà ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “intron” dùng để chỉ phân tử ADN có thể được phân lập hoặc được nhận dạng từ một gen và có thể được định nghĩa chung là vùng được cắt nối trong quá trình xử lý của ARN thông tin (mARN) trước khi dịch mã. Theo cách khác, intron có thể là yếu tố ADN tổng hợp hoặc được thao tác bằng tay. Intron có thể chứa các yếu tố tăng cường có tác dụng phiên mã các gen liên kết theo cách hoạt động. Intron có thể được sử dụng như một yếu tố điều hòa để điều chỉnh biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Một cấu trúc có thể chứa một intron và intron có thể hoặc không thể khác loại với phân tử ADN có thể phiên mã. Ví dụ về các intron được biết đến trong lĩnh vực này bao gồm intron actin gạo và intron HSP70 ngô.

Ở thực vật, việc đưa một số intron vào cấu trúc gen dẫn đến tăng mARN và tích lũy protein so với cấu trúc thiếu intron. Hiệu ứng này đã được gọi là “sự tăng cường qua trung gian intron” (intron mediated enhancement-IME) của biểu hiện gen. Các intron được biết đến để kích thích sự biểu hiện ở thực vật đã được xác định trong các gen ngô (ví dụ, tubA1,

Adh1, Sh1 và Ubi1), trong các gen lúa (ví dụ, tpi) và trong các gen thực vật hai lá mầm như các gen từ cây thuốc lá cảnh (ví dụ, rbcS), khoai tây (ví dụ: st-ls1) và từ *Arabidopsis thaliana* (ví dụ: ubq3 và pat1). Đã chứng minh được rằng việc xóa hoặc đột biến trong các vị trí ghép của intron làm giảm biểu hiện gen, chỉ ra rằng việc ghép có thể cần thiết cho IME. Tuy nhiên, IME ở thực vật hai lá mầm đã được chứng minh bằng các đột biến điểm trong các vị trí ghép của gen pat1 từ *A. thaliana*. Nhiều cách sử dụng của cùng một intron trong một thực vật đã được chứng minh là có nhược điểm. Trong những trường hợp đó, cần phải có một tập hợp các yếu tố kiểm soát cơ bản để xây dựng các yếu tố ADN tái tổ hợp thích hợp. Các intron làm ví dụ hữu ích trong việc thực hành sáng chế được trình bày dưới dạng SEQ ID NO: 9, 11, 17, 33 và 41.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử kết thúc phiên mã 3’”, “vùng không dịch mã 3’” hoặc “3’ UTR” dùng để chỉ phân tử ADN được sử dụng trong quá trình phiên mã đối với vùng không dịch mã chứa phần 3’ của phân tử mARN. Vùng không dịch mã 3’ của phân tử mARN có thể được tạo ra bởi sự phân tách cụ thể và polyadenyl hóa 3’, còn được gọi là đuôi polyA. 3’ UTR có thể được liên kết theo cách hoạt động với và nằm xuôi dòng của 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, xử lý mARN, hoặc biểu hiện gen. Các đuôi polyA được cho là có chức năng ổn định mARN và bắt đầu sự dịch mã. Ví dụ về phân tử kết thúc phiên mã 3’ trong lĩnh vực này là vùng nopal synthase 3’; vùng hsp17 3’ lúa mì, vùng 3’ dưới đơn vị nhỏ rubisco của cây đậu Hà lan, vùng E6 3’ của cây bông, và coixin 3’ UTR.

3’ UTR thường tìm thấy cách sử dụng có lợi để biểu hiện tái tổ hợp các phân tử ADN đặc hiệu. 3’ UTR yếu có tiềm năng tạo ra sự đọc hết, mà có thể ảnh hưởng đến sự biểu hiện của phân tử ADN nằm trong các catxet biểu hiện lân cận. Kiểm soát thích hợp việc chấm dứt phiên mã có thể ngăn việc đọc hết các trình tự ADN (ví dụ, các catxet biểu hiện khác) được định vị xuôi dòng và còn có thể cho phép tái chế ARN polymeraza hiệu quả để cải thiện sự biểu hiện gen. Kết thúc hiệu quả sự phiên mã (giải phóng ARN polymeraza II từ ADN) là điều kiện tiên quyết để bắt đầu lại quá trình phiên mã và do đó ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ phiên mã tổng thể. Sau khi kết thúc phiên mã, mARN thuần thực được giải phóng khỏi vị trí tổng hợp và mẫu được vận chuyển đến tế bào chất. Các mARN của sinh vật có nhân điển hình được tích lũy dưới dạng poly(A) *in vivo*, gây khó khăn cho việc phát hiện các vị trí kết thúc phiên mã bằng các phương pháp thông

thường. Tuy nhiên, việc dự đoán các 3' UTR chức năng và hiệu quả bằng các phương pháp tin sinh học là khó khăn ở chỗ không có trình tự ADN được bảo toàn cho phép dự đoán dễ dàng về 3' UTR hiệu quả.

Từ quan điểm thực tế, thông thường có lợi khi 3' UTR được sử dụng trong catxet biểu hiện có các đặc điểm sau. Đầu tiên, 3' UTR phải có khả năng kết thúc hiệu quả quá trình phiên mã của gen chuyển và ngăn chặn việc đọc hết bản phiên mã vào trình tự ADN bất kỳ lân cận mà có thể bao gồm một catxet biểu hiện khác như trong trường hợp có nhiều catxet biểu hiện cư trú trong một ADN chuyển (T-ADN) hoặc ADN nhiễm sắc thể lân cận mà T-ADN đã được cài xen vào. Thứ hai, 3' UTR không được làm giảm hoạt động phiên mã do trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, trình tự tăng cường và intron được sử dụng để thúc đẩy sự biểu hiện của phân tử ADN. Cuối cùng, trong công nghệ sinh học thực vật, 3' UTR thường được sử dụng để môi các phản ứng khuếch đại của ARN phiên mã ngược được chiết xuất từ thực vật đã được biến nạp và được sử dụng để: (1) đánh giá hoạt động phiên mã hoặc biểu hiện của băng catxet biểu hiện khi được tích hợp vào nhiễm sắc thể thực vật; (2) đánh giá số lượng bản sao của phần cài xen trong ADN thực vật; và (3) đánh giá tình trạng tiếp hợp giao tử của hạt giống thu được sau khi nhân giống. 3' UTR cũng được sử dụng trong các phản ứng khuếch đại ADN được chiết xuất từ thực vật đã được biến nạp để mô tả tính nguyên vẹn của catxet được cài xen. 3' UTR hữu ích trong việc thực hành sáng chế được trình bày dưới dạng SEQ ID NO: 29, 34, 35, 36, 37 và 44.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự tăng cường” hoặc “yếu tố tăng cường” đề cập đến yếu tố điều hòa tác động *cis*, còn được gọi là yếu tố *cis*, là một khía cạnh của toàn bộ kiểu biểu hiện, nhưng thường là không đủ điều khiển phiên mã, của phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động. Không giống các trình tự khởi đầu, các yếu tố tăng cường thường không bao gồm vị trí bắt đầu phiên mã (TSS) hoặc hộp TATA hoặc trình tự ADN tương đương. Trình tự khởi đầu hoặc đoạn khởi đầu về mặt tự nhiên có thể bao gồm một hoặc nhiều các yếu tố tăng cường mà ảnh hưởng đến sự phiên mã của trình tự ADN được liên kết theo cách hoạt động. Yếu tố tăng cường còn có thể được dung hợp với trình tự khởi đầu để tạo thành yếu tố *cis* trình tự khởi đầu dạng khảm, là một khía cạnh của toàn bộ việc điều biến sự biểu hiện gen. Ví dụ về yếu tố tăng cường thu được từ trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) được đề xuất là SEQ ID NO:24 (E-At.GSP571.nno:1).

Nhiều yếu tố tăng cường trình tự khởi đầu được cho là liên kết các protein liên kết ADN và/hoặc ảnh hưởng đến cấu trúc liên kết của ADN, tạo ra cấu hình cục bộ cho phép chọn lọc hoặc hạn chế sự tiếp cận của ARN polymeraza vào mẫu ADN hoặc tạo điều kiện cho việc mở chọn lọc chuỗi xoắn kép tại vị trí bắt đầu phiên mã. Yếu tố tăng cường có thể làm chức năng liên kết các yếu tố phiên mã để điều hòa phiên mã. Một số yếu tố tăng cường liên kết với nhiều hơn một yếu tố phiên mã, và các yếu tố phiên mã có thể tương tác với các ái lực khác nhau với nhiều hơn một miền trình tự tăng cường. Các yếu tố tăng cường có thể được nhận dạng nhờ một số kỹ thuật, bao gồm sự phân tích khuyết đoạn, tức là, xóa bỏ một hoặc nhiều nucleotit từ đầu 5' hoặc bên trong đến trình tự khởi đầu; phân tích protein liên kết ADN bằng cách sử dụng dấu ấn ADNaza I; can thiệp metyl hóa; thử nghiệm dịch chuyển điện di; dấu ấn bộ gen *in vivo* bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymeraza chain reaction-PCR) qua trung gian thắt nút; và các thử nghiệm thông thường khác hoặc bằng cách phân tích mức đồng nhất trình tự ADN sử dụng motif yếu tố *cis* đã biết hoặc các yếu tố tăng cường ở dạng trình tự đích hoặc motif đích với các phương pháp so sánh trình tự ADN thông thường, như BLAST. Cấu trúc chính xác của miền trình tự tăng cường còn có thể được thử nghiệm bằng cách gây đột biến (hoặc thế) một hoặc nhiều nucleotit hoặc bằng các phương pháp thông thường khác đã biết trong lĩnh vực này. Các yếu tố tăng cường có thể thu được bằng tổng hợp hóa học hoặc bằng cách phân lập từ các yếu tố điều hòa mà bao gồm các yếu tố này, và chúng có thể được tổng hợp bằng nucleotit chặn đầu bổ sung chứa vị trí enzym giới hạn hữu ích để tạo điều kiện thuận lợi cho thao tác tiếp theo. Do đó, mô hình, cấu trúc, và sử dụng các yếu tố tăng cường theo các phương pháp được mô tả ở đây để điều biến sự biểu hiện các phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động được bao gồm bởi sáng chế. Trình tự tăng cường hữu ích làm ví dụ để thực hành sáng chế được trình bày dưới dạng SEQ ID NO:24.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khảm” đề cập đến phân tử ADN đơn được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất lẫn thứ hai đều thường không thấy trong tự nhiên với cấu hình đó, tức là được dung hợp với nhau. Do đó, phân tử ADN khảm là phân tử ADN mới thường không thấy trong tự nhiên. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “trình tự khởi đầu dạng khảm” đề cập đến trình tự khởi đầu được tạo ra nhờ sự thao tác như vậy đối với các phân tử ADN. Trình tự khởi đầu dạng khảm có thể kết hợp hai hoặc nhiều đoạn ADN chẳng hạn, dung hợp trình tự khởi đầu với yếu tố tăng cường. Do đó, kiểu, cấu trúc, và sử dụng các trình tự

khởi đầu dạng khảm theo các phương pháp được mô tả ở đây để điều biến sự biểu hiện của các phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động được bao gồm bởi sáng chế. Trình tự khởi đầu dạng khảm làm ví dụ được trình bày ở đây dưới dạng SEQ ID NO:25 (P-At.GSP571/442).

Các yếu tố điều hòa dạng khảm có thể được thiết kế để bao gồm các yếu tố cấu thành khác nhau có thể được liên kết theo cách hoạt động bằng nhiều phương pháp khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, như phân cắt và thất enzym hạn chế, tách dòng độc lập với thất, lắp ráp mô-đun các sản phẩm PCR trong quá trình khuếch đại, hoặc tổng hợp hóa học trực tiếp các yếu tố điều hòa, cũng như các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực này. Các yếu tố điều hòa dạng khảm khác nhau thu được có thể là bao gồm các yếu tố giống nhau, hoặc các biến thể của các yếu tố cấu thành giống nhau, nhưng khác nhau về trình tự ADN hoặc trình tự ADN bao gồm trình tự ADN liên kết hoặc các trình tự cho phép các bộ phận cấu thành được liên kết theo cách hoạt động. Theo sáng chế, các trình tự ADN được đề xuất dưới dạng SEQ ID NO:1-32 và SEQ ID NO:43-45 có thể tạo ra các trình tự tham chiếu yếu tố điều hòa, trong đó các yếu tố cấu thành bao gồm trình tự tham chiếu có thể được nối bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và có thể bao gồm thay thế, xóa và/hoặc cài xen một hoặc nhiều nucleotit hoặc các đột biến xảy ra tự nhiên trong quá trình biến nạp tế bào thực vật và vi khuẩn.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “biến thể” đề cập đến phân tử ADN thứ hai, yếu tố điều hòa này là trong chế phẩm tương tự với, nhưng không giống với phân tử ADN thứ nhất, và trong đó phân tử ADN thứ hai vẫn còn độ chức nói chung, tức là kiểu biểu hiện giống nhau hoặc tương tự, ví dụ nhờ không ít thì nhiều hoạt động phiên mã tương đương, của phân tử ADN thứ nhất. Biến thể có thể là phiên bản ngắn hơn hoặc bị cắt bớt của phân tử ADN thứ nhất hoặc phiên bản thay đổi của trình tự của phân tử ADN thứ nhất, như một phiên bản với các vị trí enzym hạn chế khác nhau và/hoặc sự xóa bỏ, thay thế, hoặc cài xen bên trong. “Biến thể” còn có thể bao gồm yếu tố điều hòa có trình tự nucleotit bao gồm sự thế, xóa bỏ, hoặc cài xen một hoặc nhiều nucleotit của trình tự tham chiếu, trong đó yếu tố điều hòa thu được có hoạt động phiên mã hoặc dịch mã không ít thì nhiều hơn hoặc hoạt động phiên mã hoặc dịch mã tương đương so với phân tử điều hòa gốc tương ứng. Theo sáng chế, trình tự polynucleotit được đề xuất ở dạng SEQ ID NO:1-32 và SEQ ID NO:43-45 có thể được sử dụng để tạo ra các biến thể mà tương tự trong chế phẩm, nhưng không giống với trình tự ADN của yếu tố điều hòa gốc, trong khi vẫn giữ độ chức nói chung, tức

là kiểu biểu hiện giống nhau hoặc tương tự, của yếu tố điều hòa gốc. Việc tạo ra các biến thể này của sáng chế nằm trong hiểu biết của chuyên gia trong lĩnh vực này dựa vào phần mô tả và được bao gồm trong phạm vi của sáng chế.

Hiệu quả của việc cải biến, sao chép, hoặc xóa được mô tả trong tài liệu này về các khía cạnh biểu hiện mong muốn của một gen chuyển cụ thể có thể được kiểm tra bằng thực nghiệm trong các thử nghiệm thực vật ổn định và tạm thời, như được mô tả trong phần ví dụ thực hiện sáng chế, để xác nhận kết quả, mà có thể thay đổi tùy thuộc vào những thay đổi được thực hiện và mục tiêu của sự thay đổi trong phân tử ADN ban đầu.

Cấu trúc

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cấu trúc” có nghĩa là phân tử ADN tái tổ hợp bất kỳ như plasmid, cosmid, virus, thể thực khuẩn, hoặc phân tử ADN hoặc ARN thẳng hoặc vòng, thu được từ nguồn bất kỳ, có khả năng tích hợp bộ gen hoặc sao chép tự chủ, bao gồm phân tử ADN trong đó ít nhất một phân tử ADN đã được liên kết với một phân tử ADN khác theo cách hoạt động chức năng, tức là liên kết theo cách hoạt động. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vector” có nghĩa là cấu trúc bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích biến nạp, tức là đưa ADN hoặc ARN khác loại vào tế bào chủ. Một cấu trúc thường bao gồm một hoặc nhiều catxet biểu hiện. Như được sử dụng ở đây, “catxet biểu hiện” đề cập đến phân tử ADN bao gồm ít nhất một phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động với một hoặc nhiều yếu tố điều hòa, thường ít nhất là trình tự khởi đầu và 3' UTR.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được liên kết hoạt động” đề cập đến phân tử ADN thứ nhất được nối 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 có thể hoặc không thể là một phần của một phân tử ADN liền kề và có thể hoặc không thể là liền kề. Ví dụ, trình tự khởi đầu được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã nếu trình tự khởi đầu điều biến sự phiên mã của phân tử ADN có thể phiên mã được quan tâm trong tế bào. Trình tự dẫn đầu, ví dụ, được liên kết theo cách hoạt động với trình tự ADN khi nó có khả năng ảnh hưởng đến sự phiên mã hoặc dịch mã của trình tự ADN.

Cấu trúc theo sáng chế có thể được đề xuất, theo một phương án, ở dạng cấu trúc biên plasmid tạo khối u kép (Ti) có vùng biên phải (RB hoặc AGRtu.RB) và biên trái (LB

hoặc AGRtu.LB) của Ti plasmid được phân lập từ *Agrobacterium tumefaciens* bao gồm T-ADN, cùng với các phân tử vận chuyển được đề xuất bởi tế bào *A. tumefaciens*, cho phép tích hợp T-ADN vào bộ gen của tế bào thực vật (xem, ví dụ, patent Mỹ số 6,603,061). Các cấu trúc này cũng có thể chứa các đoạn ADN khung plasmid cung cấp chức năng sao chép và lựa chọn kháng sinh trong các tế bào vi khuẩn, ví dụ, nguồn gốc sao chép *Escherichia coli* như ori322, nguồn gốc sao chép phạm vi vật chủ rộng như oriV hoặc oriRi, và vùng mã hóa đối với một gen đánh dấu có thể chọn lọc như Spec/Strp mã hóa cho gen đánh dấu Tn7 aminoglycosite adenylyltransferaza (*aadA*) tạo ra tính kháng với spectinomycin hoặc streptomycin, hoặc gen đánh dấu chọn lọc được gentamicin (Gm, Gent). Để biến nạp thực vật, chủng vi khuẩn chủ thường là *A. tumefaciens* ABI, C58, hoặc LBA4404, tuy nhiên các chủng khác được biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực biến nạp thực vật có thể thực hiện chức năng theo sáng chế.

Các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để lắp ráp và đưa các cấu trúc vào trong một tế bào sao cho phân tử ADN có thể phiên mã được sao chép thành một phân tử mARN chức năng được dịch và được biểu hiện ở dạng protein. Đối với việc thực hành sáng chế, các chế phẩm và phương pháp thông thường để điều chế và sử dụng các cấu trúc và tế bào chủ được biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Vectơ điển hình hữu ích cho sự biểu hiện của axit nucleic ở thực vật bậc cao là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm vectơ thu được từ Ti plasmid của *Agrobacterium tumefaciens* và vectơ điều khiển vận chuyển pCaMVCN.

Các yếu tố điều hòa khác nhau có thể được bao gồm trong một cấu trúc, bao gồm yếu tố bất kỳ trong số các yếu tố được đề xuất ở đây. Yếu tố điều hòa bất kỳ như vậy có thể được đề xuất kết hợp với các yếu tố điều hòa khác. Sự kết hợp như vậy có thể được thiết kế hoặc cải biến để tạo ra các dấu hiệu điều hòa mong muốn. Theo một phương án, các cấu trúc của sáng chế bao gồm ít nhất một yếu tố điều hòa được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết với 3' UTR.

Cấu trúc theo sáng chế có thể bao gồm trình tự khởi đầu hoặc dẫn đầu bất kỳ được đề xuất ở đây hoặc đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, trình tự khởi đầu theo sáng chế có thể được liên kết theo cách hoạt động với trình tự dẫn đầu 5' không dịch mã khác loại như trình tự dẫn đầu thu được từ gen protein sốc nhiệt. Theo cách khác, trình tự dẫn đầu theo sáng chế có thể được liên kết theo cách hoạt động với trình tự khởi đầu khác loại như trình tự khởi đầu bản sao 35S virus khảm súp lơ.

Các catxet biểu hiện cũng có thể bao gồm trình tự mã hóa peptit vận chuyển mà mã hóa một peptit hữu ích cho việc nhắm đích tế bào phụ của protein được liên kết theo cách hoạt động, đặc biệt là lục lạp, lạp thể trắng hoặc cơ quan tế bào plastid khác; ty thể; peroxisom; không bào; hoặc một vị trí ngoại bào. Nhiều protein khu trú lục lạp được biểu hiện từ các gen hạt nhân là tiền chất và được nhắm đích đến lục lạp bằng một peptit vận chuyển lục lạp (chloroplast transit peptit-CTP). Ví dụ về các protein lục lạp được phân lập như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, những protein liên quan đến dưới đơn vị nhỏ (small subunit-SSU) của ribuloza-1,5,-bisphosphat carboxylaza, ferredoxin, ferredoxin oxyoreductaza, protein phức hợp tập hợp ánh sáng I và protein II, thioredoxin F, và enolpyruvyl shikimate phosphat synthaza (enolpyruvyl shikimate phosphate synthase-EPSPS). Peptit vận chuyển lục lạp được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 7,193,133. Người ta đã chứng minh rằng các protein không lục lạp có thể được nhắm đích vào lục lạp bằng biểu hiện của CTP khác loại liên kết theo cách hoạt động với gen chuyển mã hóa protein không lục lạp.

Các phân tử ADN có thể phiên mã

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “phân tử ADN có thể phiên mã” đề cập đến phân tử ADN bất kỳ có khả năng được phiên mã thành phân tử ARN, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phân tử có các trình tự mã hóa protein và các phân tử tạo ra các phân tử ARN có các trình tự hữu ích để ức chế gen. Loại phân tử ADN này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phân tử ADN từ cùng một loại thực vật, phân tử ADN từ một loại thực vật khác, phân tử ADN từ sinh vật khác nhau, hoặc phân tử ADN tổng hợp, như phân tử ADN chứa thông tin đối nghĩa của gen, hoặc phân tử ADN mã hóa phiên bản nhân tạo, tổng hợp hoặc sửa đổi khác của gen chuyển. Các phân tử ADN có thể phiên mã làm ví dụ để hợp nhất vào các cấu trúc của sáng chế bao gồm, ví dụ, các phân tử ADN hoặc các gen từ một loài không phải là loài mà phân tử ADN được hợp nhất vào hoặc các gen có nguồn gốc từ, hoặc có mặt trong cùng một loài, nhưng được hợp nhất vào các tế bào nhận bằng các phương pháp thao tác di truyền thay vì kỹ thuật nhân giống cổ điển.

“Gen chuyển” đề cập đến phân tử ADN có thể phiên mã khác loại với tế bào chủ ít nhất là về vị trí của nó trong bộ gen của tế bào chủ và/hoặc phân tử ADN có thể phiên mã được hợp nhất nhân tạo vào bộ 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 tổng hợp của sáng chế, có thể được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “khác loại” đề cập đến sự kết hợp của hai hoặc nhiều phân tử ADN khi sự kết hợp như vậy thường không được tìm thấy bình thường 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 một loài hoặc các gen giống nhau từ các loài khác nhau, hoặc một trong các phân tử ADN có thể được tổng hợp và không tìm thấy trong tự nhiên. Yếu tố điều hòa là khác loại đối với phân tử ADN có thể phiên mã được liên kết theo cách hoạt động nếu sự kết hợp như vậy thường không được tìm thấy trong tự nhiên, tức là, phân tử ADN có thể phiên mã không tồn tại trong tự nhiên được liên kết theo cách hoạt động với yếu tố điều hòa.

Nói chung, phân tử ADN có thể phiên mã có thể là phân tử ADN bất kỳ mà sự biểu hiện của bản sao được mong muốn. Sự biểu hiện như vậy của bản sao có thể dẫn đến dịch mã phân tử mRNA thu được, và do đó 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 biểu hiện giảm của một 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 được định hướng theo hướng đối nghĩa. Chuyên gia trong lĩnh vực này quen thuộc với việc sử dụng kỹ thuật đối nghĩa như vậy. Gen bất kỳ có thể được điều hòa một cách tiêu cực 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 phân tử dsARN, siARN hoặc miARN.

Do đó, một phương án của sáng chế là phân tử ADN tái tổ hợp bao gồm yếu tố điều hòa của sáng chế, như các yếu tố được đề xuất dưới dạng SEQ ID NO:1-32 và SEQ ID NO43-45, được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại để điều biến sự phiên mã phân tử ADN có thể phiên mã với mức mong muốn hoặc theo kiểu mong muốn khi cấu trúc được hợp nhất vào bộ gen của tế bào thực vật chuyển gen. Theo một phương án, phân tử ADN có thể phiên mã bao gồm vùng mã hóa protein của gen và theo phương án khác, phân tử ADN có thể phiên mã bao gồm vùng đối nghĩa của gen.

Các gen được quan tâm về mặt nông học

Phân tử ADN có thể phiên mã có thể là gen được quan tâm về mặt nông học. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “gen được quan tâm về mặt nông học” đề cập đến phân tử ADN có thể phiên mã mà, khi được biểu hiện trong một loại mô, tế bào hoặc loại tế bào thực vật cụ thể, sẽ tạo ra một đặc tính mong muốn. Sản phẩm của gen được quan tâm về mặt nông học có thể hoạt động trong thực vật để gây ảnh hưởng đến hình thái, sinh lý, tăng trưởng, phát triển, năng suất, thành phần hạt, profin dinh dưỡng, kháng bệnh hoặc kháng sâu bệnh, và/hoặc dung nạp môi trường hoặc hóa học hoặc có thể hoạt động như một tác nhân trừ sâu trong chế độ ăn của một loại sâu bệnh ăn thực vật. Theo một phương án của sáng chế, yếu tố điều hòa của sáng chế được đưa vào cấu trúc sao cho yếu tố điều hòa được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã mà là gen được quan tâm về mặt nông học. Trong thực vật chuyển gen chứa cấu trúc như vậy, sự biểu hiện của gen được quan tâm về mặt nông học có thể tạo ra một đặc điểm nông học có lợi. Một đặc điểm nông học có lợi có thể bao gồm, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ, kiểm soát côn trùng, năng suất biến đổi, kháng bệnh, kháng mầm bệnh, sự tăng trưởng và phát triển của thực vật được biến đổi, hàm lượng tinh bột biến đổi, hàm lượng dầu biến đổi, hàm lượng axit béo biến đổi, hàm lượng protein biến đổi, việc chín của quả biến đổi, tăng cường dinh dưỡng cho động vật và con người, sản xuất polyme sinh học, kháng áp lực môi trường, peptit được phẩm, cải thiện chất lượng chế biến, cải thiện hương vị, tiện ích sản xuất hạt giống lai, sản xuất chất xơ được cải thiện, và sản xuất nhiên liệu sinh học mong muốn.

Các ví dụ về gen được quan tâm về mặt nông học đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gen kháng thuốc diệt cỏ (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), tăng năng suất (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), kiểm soát côn trùng (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), kháng bệnh do nấm (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), kháng virus (patent Mỹ số 6,617,496; 6,608,241; 6,015,940; 6,013,864; 5,850,023; và 5,304,730), kháng giun tròn (patent Mỹ số 6,228,992), kháng bệnh do vi khuẩn (patent Mỹ số 5,516,671), tăng trưởng và phát triển thực vật (patent Mỹ số 6,723,897 và 6,518,488), sản xuất tinh bột (patent Mỹ số 6,538,181; 6,538,179; 6,538,178; 5,750,876; 6,476,295), sản xuất dầu biến đổi (patent Mỹ số 6,444,876; 6,426,447; và 6,380,462), sản xuất dầu cao (patent Mỹ số 6,495,739; 5,608,149; 6,483,008; và 6,476,295), hàm lượng axit béo được cải biến (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), sản xuất protein cao (patent Mỹ số 6,380,466), làm chín quả (patent Mỹ số 5,512,466), tăng cường dinh dưỡng cho động vật và người (patent Mỹ số 6,723,837; 6,653,530; 6,5412,59; 5,985,605; và 6,171,640), polyme sinh học (patent Mỹ số USRE37,543; 6,228,623; và 5,958,745, và 6,946,588), chịu được áp lực môi trường (patent Mỹ số 6,072,103), peptit được và các peptit tiết (patent Mỹ số 6,812,379; 6,774,283; 6,140,075; và 6,080,560), đặc điểm chế biến được cải thiện (patent Mỹ số 6,476,295), khả năng tiêu hóa được cải thiện (patent Mỹ số 6,531,648) raffinosa thấp (patent Mỹ số 6,166,292), sản xuất enzym công nghiệp (patent Mỹ số 5,543,576), mùi vị cải thiện (patent Mỹ số 6,011,199), cố định đạm (patent Mỹ số 5,229,114), sản xuất hạt giống lai (patent Mỹ số 5,689,041), sản xuất xơ (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 được quan tâm về mặt nông học có thể ảnh hưởng đến các đặc tính hoặc kiểu hình thực vật được đề cập ở trên bằng cách mã hóa phân tử ARN mà gây ra sự điều biến nhắm đích sự biểu hiện gen của gen nội sinh, ví dụ nhờ gen đối nghĩa (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,107,065); ARN ức chế ("RNAi," bao gồm sự điều biến biểu hiện gen bởi các cơ chế qua trung gian miARN-, siARN-, siARN tác động kiểu trans, và sARN được định pha, ví dụ, như được mô tả trong các đơn được công bố U.S. 2006/0200878 và U.S. 2008/0066206, và trong đơn sáng chế Mỹ 11/974,469); hoặc các cơ chế qua trung gian đồng ức chế. ARN còn có thể là phân tử ARN xúc tác (ví dụ, ribozym hoặc công tắc ribo; xem, ví dụ, U.S. 2006/0200878) được thao tác di truyền để phân cắt sản phẩm mARN nội sinh mong muốn. Các phương pháp là đã biết trong lĩnh vực này để xây dựng và đưa các cấu trúc vào tế bào theo cách mà phân tử ADN có thể phiên mã được phiên mã thành phân tử có khả năng gây ra sự ức chế gen.

Gen đánh dấu chọn lọc

Gen chuyển đánh dấu chọn lọc được cũng có thể được sử dụng với các yếu tố điều hòa của sáng chế. Như được sử dụng ở đây thuật ngữ “gen chuyển đánh dấu chọn lọc được” đề cập đến phân tử ADN có thể phiên mã mà sự biểu hiện của nó ở thực vật chuyển gen, mô hoặc tế bào, hoặc sự thiếu chúng, có thể được sàng lọc hoặc tính điểm theo một vài cách. Gen đánh dấu chọn lọc được, và các kỹ thuật chọn lọc và sàng lọc liên quan của chúng, để sử dụng trong thực hành sáng chế là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phân tử ADN có thể phiên mã mã hóa β -glucuronidaza (GUS), protein huỳnh quang xanh lá cây (GFP), các protein mà có khả năng kháng kháng sinh, và các protein có khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ. Làm ví dụ về gen chuyển đánh dấu chọn lọc được đề xuất ở dạng SEQ ID NO:42.

Biến nạp tế bào

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất các tế bào và thực vật được biến nạp bao gồm một hoặc nhiều yếu tố điều hòa được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã.

Thuật ngữ “biến nạp” đề cập đến việc đưa phân tử ADN vào vật chủ nhận. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vật chủ” đề cập đến vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật, bao gồm tế bào, mô, cơ quan, hoặc thể hệ sau của vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật. Các mô và tế bào thực vật được quan tâm đặc biệt bao gồm tế bào trần, mô sẹo, rễ, củ, hạt, thân, lá, cây con, phôi, và phần hoa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được biến nạp” đề cập đến tế bào, mô, cơ quan, hoặc sinh vật mà phân tử ADN ngoại, như cấu trúc, đã được đưa vào đó. Phân tử ADN được đưa vào có thể được hợp nhất vào ADN bộ gen của tế bào, mô, cơ quan, hoặc sinh vật nhận sao cho phân tử ADN được đưa vào được thừa hưởng bởi thế hệ tiếp theo. Tế bào hoặc sinh vật “chuyển gen” hoặc “được biến nạp” còn có thể bao gồm thế hệ sau của tế bào hoặc sinh vật và thế hệ sau được tạo ra từ chương trình nhân giống sử dụng sinh vật chuyển gen như vậy làm cha mẹ trong lai chéo và biểu hiện kiểu hình thay đổi do sự có mặt của phân tử ADN ngoại. Phân tử ADN được đưa vào còn có thể được đưa tạm thời vào tế bào nhận sao cho phân tử ADN được đưa vào không được thừa hưởng bởi thế hệ tiếp theo. Thuật ngữ “chuyển gen” đề cập đến vi khuẩn, nấm, hoặc thực vật chứa một hoặc nhiều phân tử ADN khác loại.

Có nhiều phương pháp được biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực này về việc đưa các phân tử ADN vào tế bào thực vật. Quá trình này thường bao gồm các bước chọn lọc tế bào chủ thích hợp, biến nạp tế bào chủ bằng một vector, và thu được tế bào chủ được biến nạp. Các phương pháp và vật liệu để biến nạp tế bào thực vật bằng cách đưa một cấu trúc thực vật vào bộ gen thực vật trong thực tiễn của sáng chế này có thể bao gồm các phương pháp đã biết rõ và được chứng minh bất kỳ. Các phương pháp thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở nhiễm vi khuẩn (ví dụ, *Agrobacterium*), vector BAC nhị phân, phân phối trực tiếp ADN (ví dụ, bằng cách biến nạp qua trung gian PEG, hấp thụ ADN qua trung gian ức chế/khử nước, điện di, khuấy với sợi silic cacbua, và tăng tốc các hạt được phủ ADN) và chỉnh sửa gen (ví dụ, hệ thống CRISPR-Cas), trong số các hệ thống khác.

Phần mô tả dự tính thêm rằng các yếu tố biểu hiện tổng hợp được mô tả có thể được thao tác di truyền *in planta* bằng cách sử dụng các phương pháp chỉnh sửa gen khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Các công nghệ như vậy được sử dụng để chỉnh sửa bộ gen bao gồm, nhưng không giới hạn ở ZFN (nucleaza ngón tay kềm), meganucleaza, TALEN (nucleaza tác động giống chất kích hóa phiên mã), và hệ CRISPR (hệ trình tự sắp xếp kiểu lặp đi lặp lại xen khoảng trống)/Cas (được liên kết CRISPR). Các phương pháp chỉnh sửa bộ gen này có thể được sử dụng để thay đổi trình tự yếu tố biểu hiện trong một tế bào thực vật thành một trình tự khác.

Các tế bào chủ có thể là tế bào hoặc sinh vật bất kỳ, như tế bào thực vật, tế bào tảo, tảo, tế bào nấm, nấm, tế bào vi khuẩn, hoặc tế bào côn trùng. Theo các phương án cụ thể, các tế bào chủ và các tế bào được biến nạp có thể bao gồm các tế bào từ các cây trồng.

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

Thực vật chuyển gen của sáng chế có thể tự thụ phấn để cung cấp hạt giống cho thực vật chuyển gen đồng hợp tử của sáng chế (đồng hợp tử đối với phân tử ADN tái tổ hợp) hoặc lai chéo với thực vật không chuyển gen hoặc các thực vật chuyển gen khác để cung cấp hạt giống cho thực vật chuyển gen dị hợp tử của sáng chế (dị hợp tử đối với phân tử ADN tái tổ hợp). Cả hai loại thực vật chuyển gen đồng hợp tử và dị hợp tử như vậy đều

được gọi ở đây là “thực vật thể hệ sau”. Thực vật thể hệ sau là thực vật chuyển gen có nguồn gốc từ thực vật chuyển gen ban đầu và chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Hạt giống được sản xuất bằng thực vật chuyển gen của sáng chế có thể được thu hoạch và sử dụng để trồng các thể hệ thực vật chuyển gen, tức là, cây con của sáng chế, bao gồm cấu trúc theo sáng chế và biểu hiện gen quan tâm nông học. Mô tả về các phương pháp nhân giống thường được sử dụng cho các cây trồng khác có thể được thấy trong một trong một vài tài liệu 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 chuyển gen có thể được phân tích về sự có mặt của gen hoặc các gen quan tâm và mức độ biểu hiện và/hoặc profin có được bởi các yếu tố điều hòa của sáng chế. Chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ nhiều phương pháp có sẵn để phân tích thực vật chuyển gen. Ví dụ, các phương pháp phân tích thực vật bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thâm tách Southern hoặc thâm tách Northern, phương pháp dựa trên PCR, phân tích sinh hóa, phương pháp sàng lọc kiểu hình, đánh giá thực địa, và xét nghiệm chẩn đoán miễn dịch. Sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã có thể được xác định bằng cách sử dụng thuốc thử TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) và phương pháp như được mô tả bởi nhà sản xuất và thời gian chu trình PCR được xác định bằng ma trận thử nghiệm TaqMan®. Ngoài ra, thuốc thử và phương pháp Invader® (Third Wave Technologies, Madison, WI) như được mô tả bởi nhà sản xuất có thể được sử dụng để đánh giá biểu hiện gen chuyển.

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

Sáng chế còn đề xuất sản phẩm hàng hóa được sản xuất từ thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của nó chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các sản phẩm hàng hóa của sáng chế chứa lượng ADN có thể phát hiện được bao gồm trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO:1-32 và SEQ ID NO:43-45. Như được sử dụng ở đây, “sản phẩm hàng hóa” đề cập đến chế phẩm hoặc sản phẩm bất kỳ bao gồm nguyên liệu thu được từ thực vật, hạt giống, tế bào thực vật, hoặc bộ phận thực vật chuyển gen chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo sáng chế. Các sản phẩm hàng hóa bao gồm nhưng không giới hạn ở hạt, hạt ngũ cốc, các bộ phận thực vật và bữa ăn đã được chế biến. Sản phẩm hàng hóa của sáng chế sẽ chứa một lượng ADN phát hiện được 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 hàm lượng hoặc nguồn gốc của sản phẩm hàng hóa. Phương pháp phát hiện tiêu chuẩn bất kỳ cho các phân tử ADN đều có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp phát hiện được mô tả ở đây.

Sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn dựa vào các ví dụ sau, các ví dụ này được đưa ra nhằm minh họa, và không được dự định giới hạn sáng chế, trừ khi được chỉ định. Cần được đánh giá cao bởi những chuyên gia trong lĩnh vực này rằng các kỹ thuật được mô tả trong các ví dụ sau đây đại diện cho các kỹ thuật được phát minh bởi các tác giả sáng chế để hoạt động tốt trong thực tiễn của sáng chế. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực này, dựa vào phần mô tả này, đánh giá cao rằng nhiều thay đổi có thể được thực hiện trong các phương án cụ thể được mô tả và vẫn đạt được kết quả tương tự hoặc giống mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế, do đó, tất cả các vấn đề được nêu hoặc thể hiện trong các hình vẽ đi kèm sẽ được hiểu là minh họa và không theo nghĩa hạn chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Thiết kế, tổng hợp, và tách dòng các yếu tố điều hòa tổng hợp

Các yếu tố điều hòa được nêu trong Bảng 1 là các yếu tố biểu hiện tổng hợp mới được thiết kế nhờ các phương pháp thuật toán. Các yếu tố điều hòa tổng hợp được thiết kế bằng cách tính toán này được tổng hợp hóa học và được tách dòng để tạo thành nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa tổng hợp (EXP). Hơn 1.000 yếu tố điều hòa tổng hợp được thiết kế và thử nghiệm ở các tế bào trần đậu tương và cây đậu tương được biến nạp ổn định để nhận dạng các yếu tố điều hòa tổng hợp mà đem lại các đặc tính mong muốn, như mức độ biểu

hiện protein và kiểu biểu hiện. Các yếu tố điều hòa tổng hợp được mô tả trong Bảng 1 tạo ra các kiểu biểu hiện khác nhau hữu ích trong việc điều khiển sự biểu hiện của nhiều trình tự mã hóa khác và can thiệp ARN quan tâm nông học.

Các yếu tố điều hòa tổng hợp được thiết kế bằng cách tính toán không có mức tương đồng mở rộng so với các trình tự axit nucleic đã biết bất kỳ mà tồn tại trong tự nhiên. Các EXP tổng hợp và các trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, intron và 3' UTR tương ứng được nêu trong Bảng 1. Các EXP tổng hợp được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này thành vectơ biến nạp thực vật nhị phân, được liên kết theo cách hoạt động với trình tự mã hóa β -glucuronidaza (GUS), và vectơ này được sử dụng để đánh giá các mức và các kiểu biểu hiện được tạo ra bởi các EXP tổng hợp ở cây đậu tương, cây bông và cây ngô được biến nạp ổn định.

Phân tích vị trí bắt đầu phiên mã (TSS) của yếu tố điều hòa tổng hợp và các điểm nối intron/exon có thể được thực hiện bằng cách sử dụng mô thực vật được biến nạp. Tóm lại, thực vật được biến nạp bằng vectơ biểu hiện thực vật bao gồm các đoạn ADN tách dòng được liên kết theo cách hoạt động với phân tử ADN có thể phiên mã khác loại. Tiếp đó, hệ 5' RACE để khuếch đại nhanh các đầu cADN, phiên bản 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California 92008) được sử dụng để xác nhận TSS của yếu tố điều hòa tổng hợp và các điểm nối intron/exon bằng cách phân tích trình tự ADN của bản sao mARN tạo ra.

Bảng 1. Các nhóm yếu tố biểu hiện điều hòa phiên mã tổng hợp, các trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, intron, và 3' UTR.

Chú thích	SEQ ID NO:	Kích thước (bp)	Mô tả và/hoặc các yếu tố điều hòa EXP được liên kết theo hướng 5' → 3' (SEQ ID NO):
EXP-At.GSP442.nno+At.Cyc o:3	1	855	EXP: P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)
P-At.GSP442.nno:2	2	480	Trình tự khởi đầu
L-At.GSP442.nno:1	3	20	Trình tự dẫn đầu
EXP-At.GSP571	4	500	EXP: P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6)
P-At.GSP571.nno:5	5	451	Trình tự khởi đầu
L-At.GSP571.nno:1	6	49	Trình tự dẫn đầu
EXP-At.GSP571.nno+At.Cyc o:2	7	855	EXP: P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)

Chú thích	SEQ ID NO:	Kích thước (bp)	Mô tả và/hoặc các yếu tố điều hòa EXP được liên kết theo hướng 5' → 3' (SEQ ID NO):
EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10	8	816	EXP: P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6), I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9)
I-At.GSI21.nno:2	9	309	Intron
EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1	10	810	EXP: P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6), I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11)
I-At.GSI102.nno:1	11	310	Intron
EXP-At.GSP564	12	500	EXP: P-At.GSP564.nno:3 (SEQ ID NO:13), L-At.GSP564.nno:1 (SEQ ID NO:14)
P-At.GSP564.nno:3	13	461	Trình tự khởi đầu
L-At.GSP564.nno:1	14	39	Trình tự dẫn đầu
EXP-At.GSP564.nno+At.Cyc o:2	15	855	EXP: P-At.GSP564.nno:3 (SEQ ID NO:13), L-At.GSP564.nno:1 (SEQ ID NO:14), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)
EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2	16	807	EXP: P-At.GSP564.nno:3 (SEQ ID NO:13), L-At.GSP564.nno:1 (SEQ ID NO:14), I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17)
I-At.GSI17.nno:1	17	300	Intron
EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1	18	810	EXP: P-At.GSP564.nno:3 (SEQ ID NO:13), L-At.GSP564.nno:1 (SEQ ID NO:14), I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11)
EXP-At.GSP579	19	500	EXP: P-At.GSP579.nno:2 (SEQ ID NO:20), L-At.GSP579.nno:1 (SEQ ID NO:21)
P-At.GSP579.nno:2	20	449	Trình tự khởi đầu
L-At.GSP579.nno:1	21	51	Trình tự dẫn đầu
EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3	22	810	EXP: P-At.GSP579.nno:2 (SEQ ID NO:20), L-At.GSP579.nno:1 (SEQ ID NO:21), I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11)
EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1	23	1350	EXP: E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24), P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)
E-At.GSP571.nno:1	24	422	Trình tự tăng cường
P-At.GSP571/442	25	902	Trình tự khởi đầu dạng khảm: E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24), P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2)
EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3	26	800	EXP: P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27), L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28), I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17)
P-At.GSP576.nno:4	27	458	Trình tự khởi đầu

Chú thích	SEQ ID NO:	Kích thước (bp)	Mô tả và/hoặc các yếu tố điều hòa EXP được liên kết theo hướng 5' → 3' (SEQ ID NO):
L-At.GSP576.nno:2	28	42	Trình tự dẫn đầu
T-Zm.GST59.nno:1	29	400	3' UTR
EXP-At.GSP221+At.Cyco:3	30	947	EXP: P-At.GSP221:3 (SEQ ID NO:31), L-At.GSP221:1 (SEQ ID NO:32), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)
P-At.GSP221:3	31	370	Trình tự khởi đầu
L-At.GSP221:1	32	229	Trình tự dẫn đầu
EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco	43	928	EXP: P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)
T-Zm.GST7.nno:2	44	300	3' UTR
EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1	45	855	EXP: P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27), L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28), I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33)

Ví dụ 2

Phân tích các EXP tổng hợp, EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 và EXP-At.GSP221+At.Cyco:3, điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các nhóm yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng cấu trúc biểu hiện GUS thực vật bao gồm EXP nội sinh, EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38), và hai EXP tổng hợp, EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1) và EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30). EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38) thu được từ gen VIa dưới đơn vị Xytocrom c oxidaza từ *Arabidopsis* và bao gồm trình tự khởi đầu, P-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:39), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco-1:1:1 (SEQ ID NO:41). EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1) và EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30) mỗi loại gồm trình tự khởi đầu và dẫn đầu tổng hợp được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). Trình tự của I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33) tương đồng với trình tự của I-At.Cyco-1:1:1 (SEQ ID NO:41), ngoại trừ việc

có hai nucleotit sau vị trí ghép intron được bao gồm trong trình tự của I-At.Cyco-1:1:1. Cả hai I-At.Cyco intron ghép cùng một vị trí.

Các yếu tố điều hòa được tách dòng thành vectơ biểu hiện thực vật cơ sở bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này. Vectơ biểu hiện thực vật thu được có trong vùng biên phải từ *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.biên phải), catxet chọn lọc của gen chuyển thứ nhất được sử dụng để chọn lọc các tế bào thực vật được biến nạp mà kháng với thuốc kháng sinh, spectinomycin; catxet của gen chuyển thứ hai để đánh giá hoạt động của yếu tố điều hòa, mà gồm trình tự EXP được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42) chứa intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng của khoai tây (số truy cập Genbank: X04753), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR từ gen *Gossypium barbadense* FbLate-2 (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36); và vùng biên trái từ *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.biên trái).

Các tế bào cây đậu tương được biến nạp nhờ sự biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* sử dụng các cấu trúc vectơ biến nạp nhị phân này, như đã biết rõ trong lĩnh vực này. Các tế bào thực vật được biến nạp thu được được gây cảm ứng để tạo thành cây đậu tương nguyên vẹn.

Phân tích GUS mô hóa học được sử dụng để phân tích biểu hiện định tính và định lượng của thực vật đã được biến nạp. Toàn bộ các phần mô được ủ với dung dịch nhuộm màu GUS X-Gluc (5-bromo-4-clo-3-indolyl-b-glucuronit) (1 miligam/mililit) trong khoảng thời gian thích hợp, rửa, và được kiểm tra bằng mắt thường đối với sự tạo màu xanh nước biển. Hoạt tính GUS được xác định định tính bằng cách kiểm tra trực tiếp bằng mắt hoặc kiểm tra dưới kính hiển vi bằng cách sử dụng các cơ quan và mô thực vật được chọn.

Để phân tích định lượng biểu hiện của GUS, protein tổng được chiết từ các mô được chọn của cây đậu tương đã biến nạp. Một microgam protein tổng được sử dụng với chất nền sinh huỳnh quang 4-methyleumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) trong tổng thể tích phản ứng là 50 microlit. Sản phẩm phản ứng, 4-methyleumbelliferon (4-MU), sinh huỳnh quang tối đa ở độ pH cao, trong đó nhóm hydroxyl được ion hóa. Việc bổ sung dung dịch bazơ chứa natri cacbonat đồng thời làm ngừng thử nghiệm và điều chỉnh độ pH để định lượng sản phẩm huỳnh quang. Mức phát quang được xác định với sự kích thích ở 365

nm, phát xạ ở 445 nm bằng cách sử dụng Fluoromax-3 với bộ đọc Micromax Reader, với độ rộng khe đặt ở kích thích 2 nm và phát xạ 3nm. Các giá trị được nêu ở dạng đơn vị nmol GUS/giờ/mg protein tổng.

Các mô sau được lấy mẫu để biểu hiện GUS trong thể hệ R₀; rễ giai đoạn V5, lá ấu, và lá nguồn; rễ giai đoạn R1, cuống lá, nguồn lá, và hoa; vỏ quả và hạt giống chưa trưởng thành giai đoạn R3; hạt giống-lá mầm giai đoạn R5; hạt giống-lá mầm và hạt giống-phôi giai đoạn R8. Bảng 2 thể hiện mức biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi các nhóm yếu tố điều hòa EXP thử nghiệm trong đó “ND” chỉ ra sự biểu hiện ở mô cụ thể không được xác định.

Bảng 2. Sự biểu hiện của GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương được biến nạp ổn định được điều khiển bởi các nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp và EXP nội sinh, EXP-At.Cyco:1:1.

Giai đoạn phát triển	Cơ quan	EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38)	EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1)	EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30)
V5	Rễ	151	399	928
	Lá ấu	39	65	59
	Lá nguồn	52	109	100
R1	Rễ	ND	616	1893
	Cuống lá	97	470	136
	Lá nguồn	46	177	240
	Hoa	71	277	140
R3	Hạt giống-chưa trưởng thành	64	477	ND
	Vỏ quả	84	575	702
R5	Hạt giống-lá mầm	91	564	58
R8	Hạt giống-phôi	57	149	301
	Hạt giống-lá mầm	100	1118	414

Như được thể hiện trong bảng 2, mỗi trong số các nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp có kiểu biểu hiện duy nhất ở các mô được lấy mẫu so với EXP nội sinh. Ví dụ, trình tự khởi đầu At.GSP442 tổng hợp, P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), và trình tự dẫn đầu,

L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), của EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1) tạo ra mức biểu hiện GUS lớn hơn trong tất cả các cơ quan được thử nghiệm so với EXP-At.Cyco:1:1 nội sinh (SEQ ID NO:38), mà gồm trình tự intron giống hệt. Việc phân tích TSS chứng minh TSS thích hợp. Intron đã được cắt bỏ thích hợp trong mARN thu được như mong đợi. Ngoài ra, trình tự At.GSP221 tổng hợp, P-AT.GSP221:3 (SEQ ID NO:31), và trình tự dẫn đầu, L-At.GSP221:1 (SEQ ID NO:32), của EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:30) cũng tạo ra mức biểu hiện cấu trúc cao hơn ở hầu hết các cơ quan được thử nghiệm so với EXP-At.Cyco:1:1 nội sinh, và chứng minh TSS thích hợp. Tuy nhiên, TSS của EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 không nằm ở vị trí được dự đoán – có nhiều yếu tố TATA tiềm ẩn. Điều này tạo ra mối quan tâm tiềm ẩn đối với nhiều bản sao, mà có thể tạo ra nhiều trình tự mã hóa. Như vậy, EXP-At.GSP221+At.Cyco:3 không được coi là chấp nhận được để sử dụng trong việc điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển ở các thực vật hai lá mầm đã được biến nạp ổn định. Điều này chứng minh một trong những điều phức tạp trong việc thiết kế các yếu tố biểu hiện tổng hợp. Nhiều yếu tố tổng hợp được thử nghiệm về sự phát triển và nhận dạng các yếu tố biểu hiện tổng hợp, nhưng chỉ tập hợp con nhỏ được đem lại các đặc tính và hoạt tính điều hòa mong muốn, minh họa tính phức tạp trong việc thiết kế các yếu tố điều hòa phiên mã tổng hợp hữu hiệu.

Như được thể hiện trong bảng 2, trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2) và L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3) có trong EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3 (SEQ ID NO:1) có thể điều khiển sự biểu hiện gen chuyển của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định.

Ví dụ 3

Phân tích trình tự dẫn đầu và khởi đầu At.GSP571 tổng hợp, và các intron At.GSI21 và At.GSI102 tổng hợp, điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các nhóm yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng cấu trúc biểu hiện GUS thực vật, bao gồm các EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2

(SEQ ID NO:7), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8), và EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10). Mỗi trong số các EXP tổng hợp bao gồm trình tự khởi đầu At.GSP571 tổng hợp (SEQ ID NO:5) và trình tự dẫn đầu (SEQ ID NO:6). EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 bao gồm intron *Arabidopsis* nội sinh, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 và EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 bao gồm các intron tổng hợp, I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), tương ứng. Vectơ biến nạp thực vật nhị phân giống với loại được mô tả trong Ví dụ 2 ngoại trừ việc mỗi trong số các vectơ At.GSP571 EXP bao gồm 3' UTR, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34), thu được từ gen Sali3 của *Medicago truncatula*.

Phân tích biểu hiện GUS định tính và định lượng được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2. Các mẫu mô được sử dụng để phân tích là giống như được mô tả trong Ví dụ 2. Bảng 3 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa EXP tổng hợp được thử nghiệm, trong đó “ND” chỉ ra sự biểu hiện ở mô cụ thể không được xác định.

Bảng 3. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa tổng hợp.

Giai đoạn phát triển	Cơ quan	EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4)	EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:7)	EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8)	EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10)
V5	Rễ	40	57	165	579
	Lá ấu	650	612	792	1683
	Lá nguồn	1379	1090	1475	2128
R1	Rễ	110	ND	457	645
	Cuống lá	951	1091	1267	1167
	Lá nguồn	1995	3538	2094	2129
	Hoa	703	830	1408	350
R3	Hạt giống-chưa trưởng thành	75	609	495	232
	Vỏ quả	852	2228	4014	1535
R5	Hạt giống-lá mầm	650	474	540	1433
R8	Hạt giống-phôi	1153	1004	603	1122

	Hạt giống-lá mầm	2449	4524	2533	2648
--	---------------------	------	------	------	------

Như được thể hiện trong bảng 3, trình tự dẫn đầu và khởi đầu At.GSP571 tổng hợp tạo ra sự biểu hiện cơ định ở tất cả các cơ quan được thử nghiệm. Sự biểu hiện là cao nhất ở lá và hạt giống. Phân tích TSS chứng minh TSS thích hợp. Liên kết theo cách hoạt động trình tự intron làm thay đổi sự biểu hiện ở nhiều cơ quan, tạo ra giá trị trung bình đối với biểu hiện cơ định “tinh chỉnh”. Sự khác biệt về sự biểu hiện được quan sát khi liên kết theo cách hoạt động các intron tổng hợp, I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11). Các intron tổng hợp tăng cường sự biểu hiện ở một số mô, nhưng khác nhau về mức độ tăng cường ở mỗi cơ quan. Ví dụ, tăng cường khi sử dụng intron tổng hợp I-At.GSI21.nno:2 ở vỏ quả R3 là cao hơn so với tăng cường được thấy khi sử dụng intron tổng hợp I-At.GSI102.nno:1 và intron nội sinh I-At.Cyco:2 so với EXP-At.GSP571. Sự biểu hiện chỉ hơi tăng bởi ba intron được liên kết theo cách hoạt động ở cuống lá R1. Ở hoa R1, sự biểu hiện được tăng cường bởi I-At.GSI21.nno:2 và I-At.Cyco:2, với I-At.GSI21.nno:2 tạo ra mức tăng cường biểu hiện cao và I-At.Cyco:2 tạo ra mức tăng cường vừa phải. Thú vị là, I-At.GSI102.nno:1 làm giảm sự biểu hiện ở hoa R1.

Phân tích về mARN thu được cho thấy việc xử lý thích hợp và chính xác của các yếu tố intron.

Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) và trình tự dẫn đầu L-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:6) bao gồm trong EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4) đem lại sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. Các EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:7), mà bao gồm *Arabidopsis* intron I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33), và EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8) và EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10), mà bao gồm các intron tổng hợp I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), tương ứng, tạo ra các kiểu biểu hiện cơ định duy nhất ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. Các intron tổng hợp, I-At.GSI21.nno:2 (SEQ ID NO:9) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), tạo ra sự biểu hiện tăng cường hoặc được điều biến ở nhiều cơ quan thực vật khi được liên kết theo cách hoạt động với EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4). Các kiểu biểu hiện duy nhất này có thể được sử dụng để điều khiển các gen chuyển cụ thể trong đó kiểu biểu hiện cụ thể của một trong bốn At.GSP571 EXP là được mong muốn nhất.

Ví dụ 4

Phân tích trình tự dẫn đầu và khởi động tổng hợp At.GSP564, và các intron tổng hợp At.GSI17 và At.GSI102, điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các nhóm yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng cấu trúc biểu hiện GUS thực vật, bao gồm các EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12), EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:15), EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16), và EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:18). Mỗi trong số các EXP tổng hợp bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP564.nno:3 (SEQ ID NO:13) và trình tự dẫn đầu tổng hợp L-At.GSP564.nno.1 (SEQ ID NO:14). EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 bao gồm intron *Arabidopsis*, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 và EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 bao gồm các intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), tương ứng. Vector biến nạp thực vật nhị phân giống với loại được mô tả trong Ví dụ 2, ngoại trừ việc mỗi trong số các vector At.GSP564 EXP bao gồm 3' UTR, T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO:35), thu được từ gen protein oxidoreductaza (OXR) giả định từ *Medicago truncatula*.

Phân tích biểu hiện GUS định tính và định lượng được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2. Các mẫu mô được sử dụng để phân tích là giống như được mô tả trong Ví dụ 2. Bảng 4 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa EXP tổng hợp được thử nghiệm, trong đó “ND” chỉ ra sự biểu hiện ở mô cụ thể không được xác định.

Bảng 4. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi các yếu tố điều hòa tổng hợp.

Giai đoạn phát triển	Cơ quan	EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12)	EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:15)	EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16)	EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:18)
V5	Rễ	61	108	54	145
	Lá ần	38	220	89	259
	Lá nguồn	74	421	209	1229
R1	Rễ	118	165	2348	627
	Cuống lá	90	235	273	148
	Lá nguồn	140	205	436	917
	Hoa	66	91	ND	305
R3	Hạt giống-chưa trưởng thành	26	ND	101	ND
	Vỏ quả	40	ND	749	ND
R5	Hạt giống-lá mầm	25	88	78	61
R8	Hạt giống-phôi	38	97	137	70
	Hạt giống-lá mầm	79	288	655	572

Như được thể hiện trong bảng 4, trình tự dẫn đầu và trình tự khởi đầu tổng hợp At.GSP564 tạo ra sự biểu hiện cơ định ở tất cả các cơ quan được thử nghiệm. Sự biểu hiện là cao nhất ở lá và hạt giống. Phân tích TSS chứng minh TSS thích hợp. Liên kết theo cách hoạt động trình tự intron làm thay đổi sự biểu hiện ở nhiều cơ quan, tạo ra giá trị trung bình đối với biểu hiện cơ định “tinh chỉnh”. Sự khác biệt về sự biểu hiện được quan sát khi liên kết theo cách hoạt động các intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11). Các intron tổng hợp tăng cường sự biểu hiện ở một số mô so với EXP-At.GSP564, nhưng khác nhau về mức độ tăng cường ở mỗi cơ quan. Ví dụ, mức tăng cường khi sử dụng intron tổng hợp I-At.GSI102.nno:1 ở lá nguồn V5 là cao hơn so với mức tăng cường được thấy khi sử dụng intron tổng hợp I-At.GSI17.nno:1. Ở rễ R1, mức tăng cường khi sử dụng intron tổng hợp I-At.GSI17.nno:1 là cao hơn so với mức tăng cường có được bởi intron tổng hợp I-

At.GSI102.nno:1. Cả hai intron tổng hợp tạo ra mức tăng cường biểu hiện cao hơn ở lá nguồn R1 so với intron nội sinh, I-At.Cyco:2.

Phân tích về mRNA thu được cho thấy việc xử lý thích hợp và chính xác của các yếu tố intron.

Trình tự khởi đầu tổng hợp At.GSP564, P-At.GSP564.nno.3 (SEQ ID NO:13) và trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP564.nno:1 (SEQ ID NO:14) bao gồm EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12) đem lại sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. Các EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:15), mà bao gồm *Arabidopsis* intron I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33), và EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16) và EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:18), mà bao gồm các intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), tương ứng, tạo ra các kiểu biểu hiện cơ định duy nhất ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. Các intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) và I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), tạo ra sự biểu hiện của gen chuyển được tăng cường hoặc được điều biến ở nhiều cơ quan thực vật khi được liên kết theo cách hoạt động với EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Các kiểu biểu hiện duy nhất này có thể được sử dụng để điều khiển các gen chuyển cụ thể trong đó kiểu biểu hiện cụ thể của một trong bốn At.GS564 EXP là được mong muốn nhất.

Ví dụ 5

Phân tích EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3, Điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng cấu trúc biểu hiện GUS thực vật, bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22). EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 bao gồm EXP-At.GSP579 (SEQ ID NO:19) gồm trình tự dẫn đầu và trình tự khởi đầu At.GSP (SEQ ID NO:20 và 21, tương ứng), được

liên kết theo cách hoạt động 5' với intron tổng hợp, I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11). Catxet gen chuyển GUS còn bao gồm 3' UTR, T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID NO:37) thu được từ gen protein khử nước-đáp ứng RD22 từ *Medicago truncatula*.

Phân tích biểu hiện GUS định tính và định lượng được thực hiện như được mô tả trong Ví dụ 2. Các mẫu mô được sử dụng để phân tích là giống như được mô tả trong Ví dụ 2. Bảng 5 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3, trong đó “ND” chỉ ra sự biểu hiện ở mô cụ thể không được xác định.

Bảng 5. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3.

Giai đoạn phát triển	Cơ quan	EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22)
V5	Rễ	187
	Lá ấu	311
	Lá nguồn	458
R1	Rễ	148
	Cuống lá	118
	Lá nguồn	425
	Hoa	130
R3	Hạt giống-chưa trưởng thành	ND
	Vỏ quả	ND
R5	Hạt giống-lá mầm	ND
R8	Hạt giống-phôi	127
	Hạt giống-lá mầm	266

Như được thể hiện trong bảng 5, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22) tạo ra sự biểu hiện cơ định ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. Trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP579.nno:2 (SEQ ID NO:20) và trình tự dẫn đầu L-At.GSP579.nno:1 (SEQ ID NO:21) bao gồm trong EXP-At.GSP579 (SEQ ID NO:19) điều khiển sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động. Có thể suy ra từ các ví dụ trước đó trong đó intron tổng hợp, I-At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:11), được liên kết theo kiểu hoạt động với các trình tự khởi đầu tổng hợp cơ định

khác rằng I-At.GSI102.nno:1 làm tăng hoặc điều biến biểu hiện cơ định được gây ra bởi EXP-At.GSP579 ở ít nhất một số cơ quan được lấy mẫu.

Ví dụ 6

Phân tích EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2, Điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây bông đã được biến nạp ổn định

Cây bông đã được biến nạp bằng vector, cụ thể là vector biểu hiện thực vật chứa nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp đối với sự biểu hiện.

Vector nhị phân thực vật bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:7), giống với loại được mô tả trong Ví dụ 3, được sử dụng để biến nạp ổn định cây bông. Catxet gen chuyển GUS bao gồm EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42) chứa intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng của khoai tây (số truy cập Genbank: X04753), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR từ gen FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36). Cây bông đã được biến nạp thu được được trồng và các mẫu mô thu được từ đốt 4 lá; đốt 8 cuống lá, lá ẩn, và lá nguồn; trước khi thụ phấn lá bắc gọn và chồi gọn; ra hoa bao phấn và bầu nhụy của hoa; và 8 ngày sau khi thụ phấn (days after pollination-DAP) thành quả nang được lấy mẫu và được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS định tính và định lượng.

Bảng 6 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2.

Bảng 6. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây bông đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2.

Giai đoạn	Cơ quan	Giá trị trung bình
Đốt 4	Lá	1232,57
Đốt 8	Lá, Cuống lá	223,68
	Lá, ần	612,14
	Lá, nguồn	618,9
Trước khi thụ phấn	Lá bắc gọn	381,69
	Chồi gọn	347,22
Ra hoa	Bao phấn	64,66
	Hoa, bầu nhụy	210,92
8DAP	Thành quả nang	835,94

Như được thể hiện trong bảng 6, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 được biểu hiện ở tất cả các mô được lấy mẫu. Sự biểu hiện là cao nhất ở đốt 4 lá và thấp nhất ở giai đoạn ra hoa Bao phấn. Sự biểu hiện ở đốt 8 Lá ần và nguồn là tương đối giống và bằng khoảng một nửa của đốt 4 lá. Sự biểu hiện là cũng cao ở Thành quả nang. Bảng 6 cho thấy rằng trình tự khởi đầu, P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5), có thể điều khiển sự biểu hiện cơ định ở cây bông đã được biến nạp ổn định. Intron, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33), trong EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2 làm tăng sự biểu hiện của trình tự khởi đầu P-At.GSP571.nno:5 ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định, như được nêu trong ví dụ 3.

Ví dụ 7

Phân tích trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp P-At.GSP571/442 điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector nhị phân thực vật bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:23), bao gồm trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp P-At.GSP571/442 (SEQ ID NO:25) bao gồm trình

tự tăng cường tổng hợp E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24) thu được từ trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2) và được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). Catxet gen chuyển GUS bao gồm EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42) chứa intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng của khoai tây (số truy cập Genbank: X04753), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29).

Vectơ nhị phân thực vật được sử dụng để so sánh hoạt động của trình tự khởi đầu dạng khảm cũng được xây dựng. Vectơ bao gồm EXP, EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco (SEQ ID NO:43), mà bao gồm trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). Vectơ nhị phân là giống với vectơ được mô tả trong các ví dụ 2-6, với loại trừ rằng mỗi catxet gen chuyển GUS có 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29) được liên kết theo cách hoạt động 3' với trình tự mã hóa GUS.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng hai vectơ nhị phân. Các mẫu mô được lấy từ các cơ quan được chọn ở các giai đoạn phát triển cụ thể và được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS định tính và định lượng. Bảng 7 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi các EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 và EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco.

Bảng 7. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 và EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco.

		EXP- At.GSP442+L-I- At.Cyco (SEQ ID NO:43)	EXP- At.GSP571.nno+At.GS P442.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:23)
Giai đoạn	Cơ quan	Giá trị trung bình	Giá trị trung bình
V5	Lá, ản	69,61	72,12
	Lá, nguồn	88,22	96,06
	Rễ	74,67	102,9
R1	Hoa	79,16	62,01
	Lá, Cuống lá	77,07	87
	Lá, nguồn	66,59	114,33
	Rễ	76,88	123,12
R3	Vỏ quả	93,19	102,54
	Hạt giống, chưa trưởng thành	71,15	61,62
R5	Hạt giống, lá mầm	78,72	92,83
R8	Hạt giống, lá mầm	65,55	72,15
	Hạt giống, phôi	129,95	107,66

Như được thể hiện trong bảng 7, việc bổ sung trình tự tăng cường tổng hợp E-At.GSP571.nno:1 làm tăng sự biểu hiện ở nhiều mô được lấy mẫu. Cả hai EXP tạo ra sự biểu hiện cơ định ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1, hoạt động theo cách giống như 3' UTR tự nhiên trong việc tạo ra sự kết thúc và polyadenyl hóa thích hợp của bản sao.

Ví dụ 8

Phân tích trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp P-At.GSP571/442 điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây bông đã được biến nạp ổn định

Cây bông đã được biến nạp bằng vector, cụ thể là vector biểu hiện thực vật chứa nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây bông đã được biến nạp bằng vector nhị phân thực vật bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:23), mà bao gồm

trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp P-At.GSP571/442 (SEQ ID NO:25) bao gồm trình tự tăng cường tổng hợp E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24) thu được từ trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP442.nno:2 (SEQ ID NO:2) và được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP442.nno:1 (SEQ ID NO:3), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2 (SEQ ID NO:40), mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33). Catxet gen chuyển GUS bao gồm EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42) chứa intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng của khoai tây (số truy cập Genbank: X04753), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29). Các cây bông đã biến nạp thu được được trồng và các mẫu mô thu được từ đốt 4 lá; đốt 8 cuống lá, lá ần, và lá nguồn; trước khi thụ phấn lá bắc gọn và chồi gọn; ra hoa bao phấn và bầu nhụy của hoa; và 8 ngày sau khi thụ phấn (DAP) thành quả nang được lấy mẫu và được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS định tính và định lượng.

Bảng 8 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 trong đó “bdl” nghĩa là dưới giới hạn phát hiện (below detection limit).

Bảng 8. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây bông đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1.

Giai đoạn	Cơ quan	Giá trị trung bình
Đốt 4	Lá	177,74
Đốt 8	Lá, cuống lá	bdl
	Lá, ần	108,39
	Lá, nguồn	294,99
Trước khi thụ phấn	Lá bắc gọn	78,84
	Chồi gọn	118,21
Ra hoa	Bao phấn	69,19
	Hoa, bầu nhụy	69,78
8DAP	Thành quả nang	159,58

Như được thể hiện trong bảng 8, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:23) có thể điều khiển sự biểu hiện GUS cơ định ở các mô được lấy mẫu. Sự biểu hiện ở cuống lá được xác định là dưới giới hạn phát hiện. Sự biểu hiện là cao nhất ở đốt 8 lá nguồn. Sự biểu hiện là tương đối bằng nhau ở bao phần của hoa và bầu nhụy của hoa. Ngoài ra, 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29) hoạt động theo cách giống như 3' UTR tự nhiên trong việc tạo ra sự kết thúc và polyadenyl hóa thích hợp của bản sao.

Ví dụ 9

Phân tích EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1, Điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, cụ thể là vector biểu hiện thực vật chứa nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector nhị phân thực vật bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:45). Catxet gen chuyển GUS còn bao gồm 3' UTR từ gen FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36), được liên kết theo cách hoạt động 3' với trình tự mã hóa GUS. Các cây đậu tương đã biến nạp thu được được trồng và các mẫu mô của các cơ quan được chọn từ một vài giai đoạn phát triển được lấy mẫu và được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS định tính và định lượng. Sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định, được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1, được nêu trong Bảng 9.

Bảng 9. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1.

Giai đoạn phát triển	Cơ quan	Giá trị trung bình
V5	Rễ	60,95
	Lá ản	97,43
	Lá nguồn	181,64
R1	Rễ	82,4
	Cuống lá	208,28

	Lá nguồn	214
	Hoa	123,37
R3	Hạt giống-chưa trưởng thành	95,29
	Vỏ quả	158,24
R5	Hạt giống-lá mầm	85,97
R8	Hạt giống-phôi	67,4
	Hạt giống-lá mầm	52,92

Như được thể hiện trong bảng 9, EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1 (SEQ ID NO:45) tạo ra sự biểu hiện cơ định ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định. Trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) và trình tự dẫn đầu L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) điều khiển sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động. Có thể suy ra từ các ví dụ trước đó trong đó intron, I-At.Cyco:2 (SEQ ID NO:33), được liên kết theo kiểu hoạt động với các trình tự khởi đầu cơ định tổng hợp khác, rằng I-At.Cyco:2 làm tăng hoặc điều biến biểu hiện cơ định được gây ra bởi P-At.GSP576.nno:4 ở ít nhất một số cơ quan được lấy mẫu.

Ví dụ 10

Phân tích EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, Điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các nhóm yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương được biến nạp bằng vector nhị phân thực vật bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO:26), hoặc EXP, EXP-At.Cyco:1:1 (SEQ ID NO:38). Catxet gen chuyển GUS còn bao gồm 3' UTR từ gen FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36) được liên kết theo cách hoạt động 3' với trình tự mã hóa GUS. Các cây đậu tương được biến nạp thu được được trồng và các mẫu mô của các cơ quan được chọn từ một vài giai đoạn phát triển được lấy mẫu và được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS định tính và định lượng. Sự biểu hiện GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định, được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, được so sánh với sự biểu hiện được điều khiển bởi

EXP-At.Cyco:1:1. Sự biểu hiện của GUS ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 là có luận chứng về khả năng của trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) và trình tự dẫn đầu L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) điều khiển sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động.

Như được chứng minh trong các ví dụ 9 và 11, trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) và trình tự dẫn đầu L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) điều khiển sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động. Như được chứng minh trong Ví dụ 4, intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17) làm tăng hoặc điều biến sự biểu hiện gen chuyển ở nhiều cơ quan thực vật khi được liên kết theo cách hoạt động với EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Tương tự, có thể có lý do mong đợi rằng sự biểu hiện của trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP576.nno:4 và trình tự dẫn đầu L-At.GSP576.nno:2 có thể làm tăng hoặc điều biến theo cách tương tự.

Ví dụ 11

Phân tích EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3, Điều khiển sự biểu hiện GUS ở cây bông đã được biến nạp ổn định

Cây bông đã được biến nạp bằng vector, cụ thể là vector biểu hiện thực vật chứa nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của nhóm yếu tố điều hòa tổng hợp được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây bông đã được biến nạp bằng vector nhị phân bao gồm EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO:26), như được nêu trước đó trong Ví dụ 10. Catxet gen chuyển GUS còn bao gồm 3' UTR từ gen FbLate-2 *Gossypium barbadense* (T-Gb.FbL2:1, SEQ ID NO:36) được liên kết theo cách hoạt động 3' với trình tự mã hóa GUS. Các cây bông đã biến nạp thu được được trồng và các mẫu mô thu được từ đốt 4 lá; đốt 8 cuống lá, lá ần, và lá nguồn; trước khi thụ phấn lá bắc gọn và chồi gọn; ra hoa bao phấn và bầu nhụy của hoa; và 8 ngày sau khi thụ phấn (DAP) thành quả nang được lấy mẫu và được thử nghiệm về sự biểu hiện GUS định tính và định lượng.

Bảng 10 thể hiện sự biểu hiện GUS định lượng trung bình đối với mỗi mô được lấy mẫu được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 tổng hợp.

Bảng 10. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây bông đã được biến nạp ổn định được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3.

Giai đoạn	Cơ quan	Giá trị trung bình
Đốt 4	Lá	579,03
Đốt 8	Lá, Cuống lá	301,57
	Lá, ản	159,4
	Lá, nguồn	577,11
Trước khi thụ phấn	Lá bắc gọn	262,66
	Chồi gọn	223,59
Ra hoa	Bao phấn	171,2
	Hoa, bầu nhụy	109
8DAP	Thành quả nang	433,64

Như được thể hiện trong bảng 10, sự biểu hiện cơ định được điều khiển bởi EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3 (SEQ ID NO: 26) của gen chuyển GUS ở cây bông đã được biến nạp ổn định. Sự biểu hiện là cao nhất ở đốt 4 lá, đốt 8 lá nguồn, và 8DAP thành quả nang. Trình tự khởi đầu tổng hợp P-At.GSP576.nno:4 (SEQ ID NO:27) và trình tự dẫn đầu L-At.GSP576.nno:2 (SEQ ID NO:28) có thể điều khiển sự biểu hiện cơ định của gen chuyển được liên kết theo cách hoạt động ở cây bông đã được biến nạp ổn định. Như được chứng minh trong Ví dụ 4, intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:17), làm tăng hoặc điều biến sự biểu hiện gen chuyển ở nhiều cơ quan thực vật khi được liên kết theo cách hoạt động với EXP-At.GSP564 (SEQ ID NO:12). Tương tự, có thể có lý do mong đợi rằng sự biểu hiện của trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP576.nno:4 và trình tự dẫn đầu, L-At.GSP576.nno:2, có thể làm tăng hoặc điều biến theo cách tương tự ở cây bông đã được biến nạp ổn định.

Ví dụ 12

Các yếu tố tăng cường thu được từ yếu tố điều hòa

Trình tự tăng cường thu được từ các yếu tố khởi đầu được thể hiện ở dạng SEQ ID NO: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31, và 39. Các yếu tố tăng cường này có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố điều hòa *cis* mà khi được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với yếu tố khởi đầu, hoặc được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng

cường bổ sung được liên kết theo cách hoạt động với trình tự khởi đầu, có thể làm tăng hoặc điều biến mức độ biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã, hoặc tạo ra sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã ở kiểu tế bào hoặc cơ quan thực vật cụ thể hoặc tại thời điểm cụ thể trong quá trình phát triển hoặc nhịp sinh học. Trình tự tăng cường có thể được tạo ra bằng cách loại bỏ hộp TATA hoặc các yếu tố tương tự về mặt chức năng và trình tự xuôi dòng bất kỳ từ các trình tự khởi đầu mà cho phép sự phiên mã được bắt đầu từ các trình tự khởi đầu được thể hiện ở dạng SEQ ID NO: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31, và 39 hoặc các đoạn của chúng. Ví dụ, trình tự tăng cường tổng hợp, E-At.GSP571.nno:1 (SEQ ID NO:24) thu được từ trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP571.nno:5 (SEQ ID NO:5) và gồm các nucleotit 1 đến 422 của P-At.GSP571.nno:5, loại bỏ trình tự xuôi dòng 3' mà cũng chứa hộp TATA của trình tự khởi đầu tổng hợp.

Việc tinh chỉnh thêm các yếu tố tăng cường có thể được yêu cầu và được xác thực theo kinh nghiệm. Ngoài ra, vị trí của yếu tố tăng cường so với các yếu tố khác trong nhóm yếu tố điều hòa dạng khảm cũng được xác định theo kinh nghiệm, vì thứ tự của mỗi yếu tố trong nhóm yếu tố điều hòa dạng khảm có thể đem lại các tác dụng khác nhau, tùy thuộc vào các vị trí tương đối của mỗi yếu tố. Một số yếu tố khởi đầu sẽ có nhiều hộp TATA hoặc các yếu tố giống hộp TATA và nhiều vị trí bắt đầu phiên mã hữu hiệu. Trong các trường hợp đó, trước tiên có thể cần thiết phải nhận dạng vị trí của TSS thứ nhất và sau đó bắt đầu thiết kế trình tự tăng cường bằng cách sử dụng TSS thứ nhất để ngăn việc khởi phát phiên mã hữu hiệu khởi xảy ra trong yếu tố tăng cường giả định.

Các yếu tố tăng cường, thu được từ các yếu tố khởi đầu tổng hợp được thể hiện ở dạng SEQ ID NO: 2, 5, 13, 20, 25, 27, 31, và 39 được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với yếu tố khởi đầu, hoặc được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng cường bổ sung được liên kết theo cách hoạt động với trình tự khởi đầu. Theo cách khác, các yếu tố tăng cường có thể được tách dòng, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, để tạo ra yếu tố tăng cường lớn hơn bao gồm hai hoặc nhiều bản sao của trình tự tăng cường và được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với yếu tố khởi đầu, hoặc được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng cường bổ sung

được liên kết theo cách hoạt động với trình tự khởi đầu tạo ra yếu tố điều hòa phiên mã dạng khảm. Các yếu tố tăng cường còn có thể được tách dòng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để được liên kết theo cách hoạt động 5' với yếu tố khởi đầu thu được từ sinh vật thuộc chi khác nhau, hoặc được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng cường bổ sung thu được từ các sinh vật chi khác được liên kết theo cách hoạt động với trình tự khởi đầu thu được từ sinh vật chi giống nhau hoặc khác nhau, thu được yếu tố điều hòa dạng khảm. Vector biến nạp thực vật biểu hiện GUS có thể được xây dựng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này giống với các cấu trúc được mô tả trong Ví dụ 2 trong đó vector biểu hiện thực vật thu được chứa vùng biên phải từ *Agrobacterium tumefaciens* (B-AGRtu.biên phải), catxet chọn lọc của gen chuyển thứ nhất được sử dụng để chọn lọc các tế bào thực vật được biến nạp mà kháng với thuốc kháng sinh, spectinomycin; và catxet của gen chuyển thứ hai để kiểm tra yếu tố tăng cường bao gồm yếu tố tăng cường được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với yếu tố khởi đầu hoặc được liên kết theo cách hoạt động 5' hoặc 3' với các yếu tố tăng cường bổ sung mà lần lượt được liên kết theo cách hoạt động với trình tự khởi đầu mà được liên kết theo cách hoạt động 5' với yếu tố dẫn đầu, được liên kết theo cách hoạt động với trình tự mã hóa đối với β -glucuronidaza (GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1, SEQ ID NO:42) chứa intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng của khoai tây (số truy cập Genbank: X04753), được liên kết theo cách hoạt động với vùng kết thúc 3', và vùng biên trái từ *A. tumefaciens* (B-AGRtu.biên trái). Các plasmid thu được được sử dụng để biến nạp cây đậu tương hoặc các thực vật chi khác bằng các phương pháp được mô tả trong các ví dụ. Theo cách khác, các tế bào trần thu được từ cây đậu tương hoặc các thực vật chi khác được biến nạp bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để thực hiện các thử nghiệm tạm thời.

Sự biểu hiện GUS được điều khiển bởi yếu tố điều hòa bao gồm một hoặc nhiều trình tự tăng cường được đánh giá trong các thử nghiệm thực vật ổn định hoặc tạm thời để xác định các tác dụng của yếu tố tăng cường đối với sự biểu hiện của phân tử ADN có thể phiên mã. Các cải biến đối với một hoặc nhiều yếu tố tăng cường hoặc sự sao chép một hoặc nhiều yếu tố tăng cường có thể được thực hiện dựa trên thí nghiệm thực nghiệm và sự điều hòa biểu hiện gen thu được được quan sát bằng cách sử dụng mỗi chế

phẩm yếu tố điều hòa. Thay đổi các vị trí tương đối của một hoặc nhiều trình tự tăng cường trong các yếu tố điều hòa thu được hoặc yếu tố điều hòa dạng khảm có thể ảnh hưởng đến hoạt động phiên mã hoặc tính đặc hiệu của yếu tố điều hòa hoặc yếu tố điều hòa dạng khảm và được xác định theo kinh nghiệm để nhận dạng trình tự tăng cường tốt nhất cho profin biểu hiện gen chuyển mong muốn trong cây đậu tương hoặc thực vật chi khác.

Ví dụ 13

Phân tích tác dụng đối với sự biểu hiện GUS được gây ra bởi 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2, ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng vector, đặc biệt là vector biểu hiện thực vật chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Các cây thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Cây đậu tương đã được biến nạp bằng hai vector nhị phân bao gồm EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4) điều khiển sự biểu hiện GUS. Catxet gen chuyển GUS còn bao gồm 3' UTR nội sinh T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34) hoặc 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44). Sự biểu hiện protein GUS được xác định định tính trong các cơ quan của cây đậu tương đã được biến nạp ổn định được biến nạp với hai cấu trúc này. Sự biểu hiện của GUS được so sánh giữa các cấu trúc. Bảng 11 dưới đây thể hiện sự biểu hiện GUS trung bình được cải biến bởi 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2, so với 3' UTR nội sinh, T-Mt.Sali3-2-1:2:1, trong đó “nd” nghĩa là không được xác định và “bdl” nghĩa là dưới giới hạn phát hiện.

Bảng 11. Sự biểu hiện GUS định lượng trung bình ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định.

Giai đoạn phát triển	Cơ quan	T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34)	T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44)	Số lần giảm
V5	Rễ	40	bdl	
	Lá ấu	650	88	7,4
	Lá nguồn	1379	278	5,0
R1	Rễ	110	72	1,5
	Cuống lá	951	199	4,8
	Lá nguồn	1995	642	3,1
	Hoa	703	139	5,1
R3	Hạt giống-chưa trưởng thành	75	bdl	
	Vỏ	852	386	2,2
R5	Hạt giống-lá mầm	650	174	3,7
R8	Hạt giống-phôi	1153	nd	
	Hạt giống-lá mầm	2449	nd	

Như được thể hiện trong bảng 11, 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2 làm giảm sự biểu hiện so với 3' UTR, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 ở tất cả các mô thử nghiệm. Mức độ giảm thay đổi đối với mỗi mô từ 1,5 lần ở R1 Rễ đến 7,4 lần ở V5 Lá ấu. Việc sử dụng 3' UTR để làm giảm sự biểu hiện ở thực vật đã được biến nạp ổn định có tính hữu dụng cao. Ví dụ, 3' UTR có thể được sử dụng kết hợp với các yếu tố điều hòa khác như các trình tự khởi đầu, trình tự dẫn đầu, và intron để tinh chỉnh biểu hiện của gen chuyển, đặc biệt là các gen trong đó sự biểu hiện cao có thể dẫn đến tác dụng bất kiểu hình mà gây hại cho thực vật được biến nạp. Phân tích bản sao GUS thu được xác nhận sự kết thúc thích hợp của bản sao được gây ra bởi 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2. 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2, có thể điều chỉnh sự biểu hiện và kết thúc thích hợp sự phiên mã ở cây đậu tương đã được biến nạp ổn định.

Ví dụ 14

Phân tích 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2 và T-Zm.GST59.nno:1, đối với sự biểu hiện GUS ở tế bào trần cây ngô

Tế bào trần lá ngô đã được biến nạp bằng vector, vector biểu hiện cụ thể chứa các yếu tố điều hòa kiểm tra điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Tế bào trần lá ngô được biến nạp thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Tế bào trần cây ngô, thu được từ mô lá, đã được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm các yếu tố biểu hiện tổng hợp và so sánh với các yếu tố biểu hiện đã biết trong lĩnh vực này. Hai vector biểu hiện được xây dựng để đánh giá hoạt động của 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) và T-Zm.GST59.nno:1 (SEQ ID NO:29) và hai vector biểu hiện cấu trúc cũng được xây dựng. Mỗi trong bốn cấu trúc bao gồm catxet chuyển gen bao gồm trình tự khởi đầu và dẫn đầu cơ định, EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO:46), được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron I-Zm.DnaK:1 (SEQ ID NO:47), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1 (SEQ ID NO:42). Vector biểu hiện được sử dụng để đánh giá các 3' UTR tổng hợp bao gồm T-Zm.GST7.nno:2 hoặc T-Zm.GST59.nno:1 được liên kết theo cách hoạt động 3' với trình tự mã hóa GUS. Một vector đối chứng bao gồm 3' UTR T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO:48) được liên kết theo cách hoạt động 3' với trình tự mã hóa GUS. Vector đối chứng khác thiếu 3' UTR.

Plasmid được sử dụng để cùng biến nạp tế bào trần và chuẩn hóa dữ liệu cũng được xây dựng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Nó bao gồm catxet chuyển gen bao gồm EXP-CaMV.35S (SEQ ID NO:46) được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa mã hóa protein huỳnh quang luciferaza NanoLuc® (Promega, Madison, WI 53711), Nluc (SEQ ID NO:49), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR, T-Os.LTP:1 (SEQ ID NO:48).

Tế bào trần lá ngô được biến nạp bằng cách sử dụng phương pháp biến nạp dựa trên PEG, tương tự với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào trần được biến nạp trong định dạng chín sáu lỗ. Mười hai microgam ADN vector thử nghiệm hoặc ADN vector đối chứng, và sáu microgam ADN vector NanoLuc® được sử dụng để biến nạp $3,2 \times 10^5$ tế bào trần mỗi lỗ. Sau khi biến nạp, các tế bào trần được ủ ở 25°C trong bóng tối trong mười sáu đến hai mươi giờ. Sau khi ủ, các tế bào trần được phân giải và dịch phân giải được sử dụng để xác định sự biểu hiện GUS và luciferaza. Để phân giải các tế bào, các tế bào trong đĩa được tạo viên kết nhờ ly tâm, rửa, tạo huyền phù lại với thể tích nhỏ hơn, và chuyển vào các ống có lỗ dạng dải. Các ống được ly tâm lần nữa và dịch nổi được hút để lại viên kết tế bào trần. Viên kết tế bào được tạo huyền phù lại trong đệm QB (100 mM KPO₄, pH 7,8; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 10% Glyxerol; 1 mM DTT). Các tế bào được phân giải bằng cách hút mạnh các tế bào bằng pipet vài

lần, tạo xoáy ống, và để cho ống ú trên nước đá trong năm phút. Sau đó, dịch phân giải được ly tâm để tạo viên kết mảnh vụn tế bào. Sau đó, dịch phân giải thu được được chuyển vào đĩa sạch.

Hoạt tính luciferaza được thử nghiệm bằng cách sử dụng chất nền thử nghiệm luciferaza Nano-Glo® (Promega, Madison, WI 53711) trong đệm QB. Tóm lại, thể tích nhỏ của dịch phân giải, đệm QB, và chất nền thử nghiệm luciferaza Nano-Glo®/dung dịch QB được trộn với nhau trong đĩa chín sáu lỗ, màu trắng. Sau đó, sự phát quang được xác định bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa PHERAstar® (BMG LABTECH Inc., Cary, NC 27513).

Hoạt tính GUS được thử nghiệm bằng cách sử dụng chất nền sinh huỳnh quang 4-methyleumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) trong tổng khối lượng phản ứng là 50 microlit. Sản phẩm phản ứng, 4-methyleumbelliferon (4-MU), phát quang tối đa ở pH cao, trong đó nhóm hydroxyl bị ion hóa. Việc bổ sung dung dịch bazơ natri cacbonat đồng thời dừng xét nghiệm và điều chỉnh pH để định lượng sản phẩm huỳnh quang. Một phần phân ước của dịch phân giải được trộn với một phần phân ước của MUG được hòa tan trong đệm QB và được ủ ở 37°C. Một phần phân ước nhỏ của hỗn hợp phản ứng dịch phân giải/MUG được loại bỏ và bổ sung vào dung dịch đệm dừng ở ba mốc thời gian khác nhau; (1) ngay sau khi trộn phản ứng dịch phân giải/MUG dưới dạng “Thời gian không phút”; (2) hai mươi phút; và (3) sáu mươi phút. Sự phát quang được đo bằng kích thích ở bước sóng 355nm, phát xạ ở 460nm bằng cách sử dụng bộ đọc đĩa PHERAstar® (BMG LABTECH Inc., Cary, NC 27513).

Ít nhất hai đĩa được sử dụng để biến nạp với bốn đến tám sự biến nạp trên mỗi đĩa cho mỗi vector biểu hiện. Đối với mỗi đĩa, mỗi cấu trúc được biến nạp trong bốn đến tám lỗ. Một phần phân ước được lấy ra từ mỗi phép biến nạp cho thử nghiệm MUG và “nM MUG được thủy phân” thu được từ đường cong chuẩn trong đĩa. Một phần phân ước cũng được lấy ra từ mỗi phép biến đổi để đọc NanoLuc® (NanoLuc® RLU). Giá trị trung bình nM MUG thủy phân / NanoLuc® RLU cho mỗi vector biểu hiện được chuẩn hóa đối với vector biểu hiện EXP-CaMV.35S/I-Zm.DnaK:1/T-Os.LTP:1 được đặt thành 100%. Bảng 12 thể hiện trung bình của giá trị trung bình của tất cả các đĩa được sử dụng để biến nạp đối với mỗi vector biểu hiện bao gồm 3' UTR tổng hợp T-Zm.GST7.nno:2 và T-Zm.GST59.nno:1, và đối chứng.

Bảng 12. Trung bình của giá trị trung bình nM MUG thủy phân/ NanoLuc® RLU đối với mỗi vector biểu hiện.

3' UTR	Trung bình của giá trị trung bình	Stderr
T-Os.LTP:1	100,00	8,09
No 3' UTR	51,95	4,71
T-Zm.GST59.nno:1	505,45	37,75
T-Zm.GST7.nno:2	345,31	40,73

Như được thể hiện trong bảng 12, vector biểu hiện không có 3' UTR được tạo ra ít biểu hiện hơn so với đối chứng T-Os.LTP:1. Việc biểu hiện được tăng cường bằng 3' UTR tổng hợp T-Zm.GST7.nno:2 và T-Zm.GST59.nno:1 so với đối chứng T-Os.LTP:1. Phân tích các bản sao chứng minh sự kết thúc hoàn toàn được gây ra bởi 3' UTR tổng hợp T-Zm.GST7.nno:2 và T-Zm.GST59.nno:1. 3' UTR tổng hợp T-Zm.GST7.nno:2 và T-Zm.GST59.nno:1 có thể điều biến sự biểu hiện và kết thúc hoàn toàn sự phiên mã trong tế bào trần lá ngô được biến nạp.

Ví dụ 15

Phân tích các yếu tố điều hòa điều khiển GUS ở tế bào trần của lá cây bông

Tế bào trần lá bông đã được biến nạp bằng vector, cụ thể là vector biểu hiện chứa các nhóm yếu tố điều hòa điều khiển sự biểu hiện của gen chuyển β -glucuronidaza (GUS). Tế bào trần lá bông được biến nạp thu được được phân tích về sự biểu hiện protein GUS để đánh giá tác động của các nhóm yếu tố điều hòa được chọn đối với sự biểu hiện.

Tế bào trần cây bông, thu được từ mô lá đã được biến nạp bằng vector biểu hiện bao gồm các yếu tố biểu hiện tổng hợp và so sánh với các yếu tố biểu hiện đã biết trong lĩnh vực này. Các thử nghiệm riêng biệt được thực hiện để đánh giá hoạt động của EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10), EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16), và EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22). Các yếu tố biểu hiện được tách dòng thành vector biểu hiện và được liên kết theo cách hoạt động với trình tự mã hóa

GUS, GOI-Ec.uidA+St.LS1:1:1 (SEQ ID NO:42) mà bao gồm intron có thể xử lý. Vector biểu hiện đối chứng bao gồm các cấu hình khác nhau của yếu tố biểu hiện đã biết.

Hai plasmid, để sử dụng trong quá trình đồng biến nạp và chuẩn hóa dữ liệu, cũng được xây dựng bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Mỗi plasmid chứa một trình tự mã hóa luciferaza cụ thể được điều khiển bởi trình tự EXP cơ định. Vector thực vật pFLUC bao gồm catxet chuyển gen với trình tự khởi đầu cơ định được liên kết theo cách hoạt động 5' với intron, (EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1, SEQ ID NO: 53), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa luciferaza (LUCIFERASE:1:3, SEQ ID NO: 54) đom đóm (*Photinus pyralis*), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR từ gen *Agrobacterium tumefaciens* nopal synthase (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 55). Vector thực vật pRLUC bao gồm catxet chuyển gen với trình tự EXP cơ định (EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1, SEQ ID NO: 56), được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa luciferaza (CR-Ren.hRenilla Lucife-0:0:1, SEQ ID NO: 57) sea pansy (*Renilla reniformis*), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR từ gen *Agrobacterium tumefaciens* nopal synthase (T-AGRtu.nos-1:1:13, SEQ ID NO: 55).

Tế bào trần lá bông được biến nạp bằng phương pháp biến nạp dựa trên PEG, đã biết trong lĩnh vực này. Các tế bào trần đã được biến nạp bằng các plasmid, pFLUC và pRLUC, và một lượng đương lượng mol của vector biểu hiện EXP. Các phép đo của cả GUS và luciferaza được tiến hành bằng cách đặt các phần phân ước của chế phẩm phân giải chứa các tế bào được biến nạp như trên vào hai khay lỗ nhỏ khác nhau. Một khay được sử dụng để đo GUS, và khay thứ hai được sử dụng để thực hiện thử nghiệm luciferaza kép bằng hệ thử nghiệm báo cáo luciferaza kép (Promega Corp., Madison, WI; xem ví dụ, Promega Notes Magazine, No: 57, 1996, p.02). Các phép đo mẫu được dựa trên nhiều phép biến nạp tương tự như được trình bày trong Ví dụ 14. Các giá trị GUS/FLUC trung bình được tính theo cách tương tự như trong Ví dụ 14, nhưng không được chuẩn hóa đối với vector EXP đối chứng.

Các EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8), và EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10) được tách dòng thành vector biểu hiện thực vật được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa GUS (SEQ ID

NO:42), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 (SEQ ID NO:34). Hai vector biểu hiện thực vật đối chứng được xây dựng với EXP, EXP-At.Bglu21+At.Cyco:2 (SEQ ID NO:50), đã biết là biểu hiện kém ở tế bào trần của lá cây bông và EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), đã biết là biểu hiện tốt ở tế bào trần của lá cây bông. Các EXP đối chứng được liên kết theo cách hoạt động với cùng trình tự 3' UTR và GUS. Ngoài ra, vector biểu hiện thực vật bao gồm catxet gen chuyển GUS bao gồm EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), được liên kết theo cách hoạt động với GUS bao gồm 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2 (SEQ ID NO:44) để đánh giá hoạt động của 3' UTR tổng hợp. Các giá trị GUS/FLUC trung bình đối với nhiều biến nạp được nêu trong Bảng 13.

Bảng 13. Các giá trị GUS/FLUC trung bình từ tế bào trần của lá cây bông đã được biến nạp

EXP	EXP SEQ ID NO:	3' UTR	3' UTR SEQ ID NO:	GUS/FLUC trung bình
EXP-At.Bglu21+At.Cyco:2	50	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	34	0,09
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	51	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	34	1,70
EXP-At.GSP571	4	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	34	0,56
EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10	8	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	34	1,02
EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1	10	T-Mt.Sali3-2-1:2:1	34	0,95
EXP-At.GSP571	4	T-Zm.GST7.nno:2	44	0,46

Như được thể hiện trong bảng 13, các EXP, EXP-At.GSP571 (SEQ ID NO:4), EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10 (SEQ ID NO:8), và EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1 (SEQ ID NO:10) chứng minh sự biểu hiện ở các tế bào trần lá cây bông. 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:10 (SEQ ID NO:44) hoạt động theo cách giống như 3' UTR nội sinh, T-Mt.Sali3-2-1:2:1.

EXP, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2 (SEQ ID NO:16) được tách dòng thành vector biểu hiện thực vật được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa

GUS (SEQ ID NO:42), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR nội sinh, T-Mt.Oxr-1:2:1 (SEQ ID NO:35). Hai vector biểu hiện thực vật đối chứng được xây dựng với EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO:52), đã biết là biểu hiện kém ở tế bào trần của lá cây bông và EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), đã biết là biểu hiện tốt ở tế bào trần của lá cây bông. Các EXP đối chứng được liên kết theo cách hoạt động với cùng trình tự 3' UTR và GUS. Các giá trị GUS/FLUC trung bình đối với nhiều biến nạp được nêu trong Bảng 14.

Bảng 14. Các giá trị GUS/FLUC trung bình từ tế bào trần của lá cây bông đã được biến nạp

EXP	EXP SEQ ID NO:	3' UTR	3' UTR SEQ ID NO:	GUS/FLU C trung bình
EXP-Gm.Sphas1:1:1	52	T-Mt.Oxr-1:2:1	35	0,01
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	51	T-Mt.Oxr-1:2:1	35	2,30
EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2	16	T-Mt.Oxr-1:2:1	35	0,34

Như được thể hiện trong bảng 14, EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:1 (SEQ ID NO:16) chứng minh sự biểu hiện ở tế bào trần của tế bào lá cây bông.

EXP, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22) được tách dòng thành vector biểu hiện thực vật được liên kết theo cách hoạt động 5' với trình tự mã hóa GUS (SEQ ID NO:42), được liên kết theo cách hoạt động 5' với 3' UTR nội sinh, T-Mt.RD22-1:2:1 (SEQ ID NO:37). Hai vector biểu hiện thực vật đối chứng được xây dựng với EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 (SEQ ID NO:52), đã biết là biểu hiện kém ở tế bào trần của lá cây bông và EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 (SEQ ID NO:51), đã biết là biểu hiện tốt ở tế bào trần của lá cây bông. Các EXP đối chứng được liên kết theo cách hoạt động với cùng trình tự 3' UTR và GUS. Các giá trị GUS/FLUC trung bình đối với nhiều biến nạp được nêu trong Bảng 15.

Bảng 15. Các giá trị GUS/FLUC trung bình từ tế bào trần của lá cây bông đã được biến nạp

EXP	EXP SEQ ID NO:	3' UTR	3' UTR SEQ ID NO:	GUS/FLUC trung bình
EXP-Gm.Sphas1:1:1	52	T-Mt.RD22- 1:2:1	37	0,01
EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3	51	T-Mt.RD22- 1:2:1	37	2,88
EXP- At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3	22	T-Mt.RD22- 1:2:1	37	1,19

Như được thể hiện trong bảng 15, EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3 (SEQ ID NO:22), chứng minh sự biểu hiện ở tế bào trần của tế bào lá cây bông.

Có minh họa và mô tả các nguyên tắc của sáng chế, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết được rằng sáng chế có thể được sửa đổi theo cách sắp xếp và chi tiết mà không nằm ngoài các nguyên tắc đó. Chủ đơn yêu cầu bảo hộ tất cả các sửa đổi thuộc tinh thần và phạm vi của yêu cầu bảo hộ. Tất cả các tài liệu công bố và bằng sáng chế được công bố được trích dẫn ở đây đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn ở cùng mức độ như mỗi công bố hoặc đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế riêng lẻ được chỉ định cụ thể và riêng lẻ được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp có có hoạt tính điều hòa gen bao gồm trình tự ADN được chọn từ nhóm gồm:
 - a) trình tự với độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90 phần trăm với SEQ ID NO:24, 25, hoặc 2 và có hoạt tính điều hòa gen; và
 - b) trình tự bao gồm bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 23, 24, 25, 2, và 3.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN được liên kết hoạt động với phân tử ADN có khả năng phiên mã khác loại.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95 phần trăm với trình tự ADN của SEQ ID NO:24, 25 hoặc 2.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 97 phần trăm với trình tự ADN của SEQ ID NO: 24, 25 hoặc 2.
5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 2, trong đó phân tử ADN có khả năng phiên mã khác loại bao gồm gen được quan tâm về mặt nông học.
6. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó gen được quan tâm về mặt nông học tạo ra khả năng dung nạp thuốc diệt cỏ cho thực vật.
7. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 5, trong đó gen được quan tâm về mặt nông học tạo ra khả năng chống lại vật gây hại cho thực vật.
8. Tế bào thực vật chuyển gen bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.
9. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 8, trong đó trình tự ADN được liên kết hoạt động với phân tử ADN có khả năng phiên mã khác loại.
10. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 8, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này là tế bào thực vật một lá mầm.
11. Tế bào thực vật chuyển gen theo điểm 8, trong đó tế bào thực vật chuyển gen này là tế bào thực vật hai lá mầm.

12. Thực vật chuyển gen, hoặc bộ phận của nó, bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.
13. Thực vật thế hệ sau của thực vật chuyển gen theo điểm 12, hoặc bộ phận của thực vật thế hệ sau này, trong đó thực vật thế hệ sau hoặc bộ phận của thực vật thế hệ sau này bao gồm phân tử ADN tái tổ hợp.
14. Hạt giống chuyển gen, trong đó hạt giống này chứa phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1.
15. Phương pháp sản xuất sản phẩm hàng hóa bao gồm bước thu được thực vật chuyển gen hoặc bộ phận của nó theo điểm 12 và sản xuất sản phẩm hàng hóa từ đó.
16. Phương pháp theo điểm 15, trong đó sản phẩm hàng hóa là thể đặc protein, thể phân lập protein, hạt, tinh bột, hạt giống, bột thô, bột, sinh khối hoặc dầu từ hạt.
17. Phương pháp biểu hiện phân tử ADN có khả năng phiên mã bao gồm bước thu được thực vật chuyển gen theo điểm 12 và trồng trọt thực vật này, trong đó ADN có khả năng phiên mã được biểu hiện.
18. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó trình tự ADN có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90 phần trăm với trình tự ADN của SEQ ID NO:23 và bao gồm phần thứ nhất có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90 phần trăm với SEQ ID NO:25, phần thứ hai có độ đồng nhất 100 phần trăm với SEQ ID NO:3.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Monsanto Technology LLC

<120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP ĐIỀU BIẾN SỰ BIỂU HIỆN GEN Ở THỰC VẬT, THỰC VẬT, TẾ BÀO THỰC VẬT, BỘ PHẬN THỰC VẬT VÀ HẠT GIỐNG CHUYỂN GEN CHỨA PHÂN TỬ ADN NÀY

<130> MONS:436WO

<150> US 62/448,019

<151> 19-01-2017

<160> 57

<170> Patent phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 855

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP442.nno+At.Cyco:3.

<400> 1

tggttaatggtt atccgaacta gtcataatta caaccgacaa aataagggtta ttttgtgtgt	60
tatagaatttt tttggacagt ttttggtttg gttttcgatt gtagtaaaaa tagatttatg	120
taataagatt tactttttctt gttgaaacaa aataatctta gaattaactc aacttttatg	180
ttagaacaaa tgataaaaaa atttcccctt ttctatgcga ttattttcaa tcagagagaa	240
atacatataa tatatataat tcaaattaat ctgccaaatt aataaatttg gattaaaatt	300
tataaatgaa acaatggtgt aaggcaatta aaaacacaac actaaaaata tgagaacatt	360
ttatctgggc attaagagtt tgggcttttag atctaaaata aaggccggcc caacgagaat	420
attaaaccct aattgacctt gttccctata tatataaacc ctatatttct ctcgtcactc	480
ctcaactctc agctaaacca cggaccgcag gtaatttctc tcctctctat ttttaccatt	540
ttccattgac gacgatctag gttttctgat ttgatttttg agaacgcctc gatgagtta	600
tagattcgta gattgggttt gagattcagt ataatttcac cggattcca attttgaac	660
cgatacctaa ttttgaattg atttggtaga tcgattggtc aaatttgaaa ttgatttttc	720
tccataatat ctgaagcgtc ttattggatc aaatctacaa catttctctg ttgaaaggat	780
cgattttttt tttcttgga catgataact tttgattatt catcaaagtt ttgttctttt	840
taatattttca caggt	855

<210> 2

<211> 480

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP442.nno:2.

<400> 2

tggttaatggtt atccgaacta gtcataatta caaccgacaa aataagggtta ttttgtgtgt	60
tatagaatttt tttggacagt ttttggtttg gttttcgatt gtagtaaaaa tagatttatg	120
taataagatt tactttttctt gttgaaacaa aataatctta gaattaactc aacttttatg	180
ttagaacaaa tgataaaaaa atttcccctt ttctatgcga ttattttcaa tcagagagaa	240
atacatataa tatatataat tcaaattaat ctgccaaatt aataaatttg gattaaaatt	300
tataaatgaa acaatggtgt aaggcaatta aaaacacaac actaaaaata tgagaacatt	360
ttatctgggc attaagagtt tgggcttttag atctaaaata aaggccggcc caacgagaat	420
attaaaccct aattgacctt gttccctata tatataaacc ctatatttct ctcgtcactc	480

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP442.nno:1.

<400> 3

ctcaactctc agctaaacca

20

<210> 4

<211> 500

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.

<400> 4

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacaa	aaagtattaa	ttaatatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttgtcac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
atatatatataa	acacacactt	cgtaaccact	catcactcac	cacaaacaga	gaatatctca	480
tctcttcttta	gcaaacaaag					500

<210> 5

<211> 500

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP571.nno:5.

<400> 5

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacaa	aaagtattaa	ttaatatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttgtcac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
atatatatataa	acacacactt	cgtaaccact	catcactcac	cacaaacaga	gaatatctca	480
tctcttcttta	gcaaacaaag					500

<210> 6

<211> 49

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP571.nno:1.

<400> 6

atcactcacc	acaaacagag	aatatctcat	ctcttcttag	caaacaaag	49
------------	------------	------------	------------	-----------	----

<210> 7

<211> 855

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.Cyco:2.

<400> 7

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacaa	aaagtattaa	ttaatatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttgtcac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
atatatatataa	acacacactt	cgtaaccact	catcactcac	cacaaacaga	gaatatctca	480
tctcttcttta	gcaaacaaag	cggaccgcag	gtaatttctc	tcctctctat	ttttaccatt	540
ttccattgac	gacgatctag	gttttctgat	ttgatttttg	agaacgcctc	gatgagttta	600
tagattcgta	tattggtttt	gagattcagt	ataatttcac	ccggattcca	atttttgaac	660
cgatacctaa	ttttgaattg	atttggtaga	tcgattggtc	aaatttgaaa	ttgatttttc	720
tccataatat	ctgaagcgtc	ttattggatc	aaatctacaa	catttctctg	ttgaaaggat	780

cgattttttt tttcttggaa catgataact tttgattatt catcaaagtt ttgttctttt 840
taatatattca caggt 855

<210> 8

<211> 816

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSI21.nno:10.

<400> 8

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacia	aaagtattaa	ttaatatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttggtac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
atatatataa	acacacactt	cgtaaccact	catcactcac	cacaaacaga	gaatatctca	480
tctcttctta	gcaaacaaaag	cggaccgcag	gtttattctt	ctctctctat	cctctctctt	540
ctgatctcga	tttgtttttt	tcgaatcgct	ctacttccag	ttagattctt	gatttgagat	600
taattagatt	gattattcta	atcgtttttt	ttgtaagcaa	ttaagattta	tcttggttta	660
tggttttctt	taggtatgac	ttgttatgta	tgctactgtt	tcagatctga	tcctctctgt	720
tggtttgtga	attctcttgt	attgttctaa	tcactgtttc	tgaatttgat	tcgggttttt	780
attgaattct	ttttatgtgt	tttggtattt	gcaggt			816

<210> 9

<211> 309

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Intron tổng hợp, I-At.GSI21.nno:2.

<400> 9

caggttttatt	cttctctctc	tatcctctct	cttctgatct	cgatttggtt	ttttcgaatc	60
gctctacttc	cagtttagatt	cttgatttga	gattaattag	attgattatt	ctaactgttt	120
tttttgtaag	caattaagat	ttatcttggt	ttatgttttt	cttttaggtat	gacttggtat	180
gtatgtcact	gtttcagatc	tgatcctctc	tggttggttg	tgaattctct	tgtattgttc	240
taatcactgt	ttctgaattt	gattcgggtt	tttattgaat	tctttttatg	tgttttggta	300
tttgcaggt						309

<210> 10

<211> 810

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSI102.nno:1.

<400> 10

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacia	aaagtattaa	ttaatatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttggtac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
atatatataa	acacacactt	cgtaaccact	catcactcac	cacaaacaga	gaatatctca	480
tctcttctta	gcaaacaaaag	tttcagggtt	agctttctct	ccgatctcgg	ctttcgatct	540
gatctcgtct	gatctccgat	ttcgatcccc	gtccgatctc	gatctgatcc	catccgatct	600
gtgattgatt	cgttgagatt	cagatctgat	cttaggatct	ctctgataga	tcatagatcc	660
aatctctcga	gatagagatg	attgatgttg	ttcagatcgg	ttttgatctc	tgatctgatc	720
agctcgattg	attcgatttg	attctcgatt	cgatttgatc	gacaattgat	ctgattctct	780
aattgatgtt	ctgtttttgt	tacagggttt				810

<210> 11
 <211> 310
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Intron tổng hợp, I-At.GSI102.nno:1.
 <400> 11
 tttcagggttt agcttttctct ccgatctcgg ctttcgatct gatctcgtct gatctccgat 60
 ttcgatcccc gtccgatctc gatctgatcc catccgatct gtgattgatt cgttgagatt 120
 cagatctgat cttaggatct ctctgataga tcatagattc aatctctcga gatagagatt 180
 attgatgttg ttcagatcgg ttttgatctc tgatctgata agctcgattg attcgatttg 240
 attctcgatt cgatttgatc gacaattgat ctgattctct aattgatgtt ctgtttttgt 300
 tacaggtttt 310

<210> 12
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.
 <400> 12
 agagttacaa tatagagaaa aaatgtattc tgtgtttttc acttttcttc ttctttgaaa 60
 atccaaaaac aactatttat tgattggcaa attgcatcaa atttttcatg ctaaatccaa 120
 cataaatata aaatctttta atcaaatata gaatctaaag atagtaggggt tttttttatt 180
 taaaatgatg tttcaaaaaa ttagaaaagca tgttttccac acttggaataa tataaataaa 240
 ttaagattta ttttttccca aacaagataa atctataaat attcatcaca atcacgtgta 300
 caaaaaataaa tccaacaaga gataaggata agccaacgga cccatatatt aggcccattt 360
 taaaataagg aaataagcag ataattatcc accaccttat ccaaaaccct agatccacaa 420
 cataaatctc tataaaaacc cttttcactc acactcacat cactcacata agaactaaaa 480
 tctctaaaga gtcgtctctg 500

<210> 13
 <211> 461
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP564.nno:3.
 <400> 13
 agagttacaa tatagagaaa aaatgtattc tgtgtttttc acttttcttc ttctttgaaa 60
 atccaaaaac aactatttat tgattggcaa attgcatcaa atttttcatg ctaaatccaa 120
 cataaatata aaatctttta atcaaatata gaatctaaag atagtaggggt tttttttatt 180
 taaaatgatg tttcaaaaaa ttagaaaagca tgttttccac acttggaataa tataaataaa 240
 ttaagattta ttttttccca aacaagataa atctataaat attcatcaca atcacgtgta 300
 caaaaaataaa tccaacaaga gataaggata agccaacgga cccatatatt aggcccattt 360
 taaaataagg aaataagcag ataattatcc accaccttat ccaaaaccct agatccacaa 420
 cataaatctc tataaaaacc cttttcactc acactcacat c 461

<210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP564.nno:1.
 <400> 14
 actcacataa gaactaaaat ctctaaagag tcgtctctg 39

<210> 15
 <211> 855
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.Cyco:2.

<400> 15

```

agagttacaa tatagagaaa aaatgtattc tgtgtttttc acttttcttc ttctttgaaa      60
atccaaaaac aactatttat tgattggcaa attgcatcaa atttttcatg ctaaatccaa      120
cataaatata aaatctttta atcaaataca gaatctaaag atagtagggg tttttttatt      180
taaaatgatg tttcaaaaaa ttagaaagca tgttttccac acttggaata taaaaataaa      240
ttaagattta ttttttccca aacaagataa atctataaat attcatcaca atcacgtgta      300
caaaaataaa tccaacaaga gataaggata agccaacgga cccatatatt aggcccattt      360
taaaataagg aaataagcag ataattatcc accaccttat ccaaaaccct agatccacaa      420
cataaatctc tataaaaacc cttttcactc acactcacat cactcacata agaactaaaa      480
tctctaaaga gtcgtctctg cggaccgcag gtaattttct tctctctat ttttaccatt      540
ttccattgac gacgatctag gttttctgat ttgattttgg agaacgcctc gatgagttta      600
tagattcgta gattggtttt gagattcagt ataatttcac cgggattcca atttttgaac      660
cgatacctaa ttttgaattg atttggtaga tcgattgggc aaatttgaaa ttgatttttc      720
tccataatat ctgaagcgtc ttattggatc aaatctacaa catttctctg ttgaaaggat      780
cgattttttt tttcttgga catgataact tttgattatt catcaaagtt ttgttctttt      840
taatatttca caggt

```

<210> 16

<211> 807

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI17.nno:2.

<400> 16

```

agagttacaa tatagagaaa aaatgtattc tgtgtttttc acttttcttc ttctttgaaa      60
atccaaaaac aactatttat tgattggcaa attgcatcaa atttttcatg ctaaatccaa      120
cataaatata aaatctttta atcaaataca gaatctaaag atagtagggg tttttttatt      180
taaaatgatg tttcaaaaaa ttagaaagca tgttttccac acttggaata taaaaataaa      240
ttaagattta ttttttccca aacaagataa atctataaat attcatcaca atcacgtgta      300
caaaaataaa tccaacaaga gataaggata agccaacgga cccatatatt aggcccattt      360
taaaataagg aaataagcag ataattatcc accaccttat ccaaaaccct agatccacaa      420
cataaatctc tataaaaacc cttttcactc acactcacat cactcacata agaactaaaa      480
tctctaaaga gtcgtctctg cggaccgcag gtaaacccag atctctttct tctcttctct      540
tcattctgat ctctccattt tcataaacc aattttttct ctgatttggt ttgatttggt      600
tggtatcttc tgtgtttcca tgggttttag aatttttagga tagatttttg tttgttcatg      660
ttattcatcg gatatataga tttcaaattc ttttgcaatt tttctctctc ttttagtttg      720
ctcaattttg gttgttggtg tgatgagtg tctctttatg ggtttatctg agcttggtga      780
gagttttttg atattgattt tgcaggt

```

<210> 17

<211> 300

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Intron tổng hợp, I-At.GSI17.nno:1.

<400> 17

```

caggtaaacc cagatctctt tcttctcttc tcttcatctc gatctctcca ttttcataaa      60
cccaattttt tctctgattt gtttgatttg gtttgatctt ttctgtgtt ccatgggttt      120
aggaatttta ggaatagattt ttgtttgttc atgttattca tcggatatat agatttcaaa      180
ttcttttgca attttctctc ctcttttagt ttgttcaatt ttggttggtt ttgtgatgag      240
tgttctcttt atgggtttat ctgagcttgg tgagagtttt ttgatattga ttttgcaggt      300

```

<210> 18

<211> 810

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP564.nno+At.GSI102.nno:1.

<400> 18

```

agagttacaa tatagagaaa aaatgtattc tgtgtttttc acttttcttc ttctttgaaa      60

```

```

atccaaaaac aactatztat tgattggcaa attgcatcaa atttttcatg ctaaatacaa 120
cataaatata aaatctttta atcaaatata gaatctaaag atagtagggg tttttttatt 180
taaaatgatg tttcaaaaaa ttagaaagca tgttttccac acttggaataa tataaataaa 240
ttaagattta ttttttccca aacaagataa atctataaat attcatcaca atcacgtgta 300
caaaaataaa tccaacaaga gataaggata agccaacgga cccatatatt aggcccat 360
taaaataagg aaataagcag ataattatcc accaccttat ccaaaaccct agatccacaa 420
cataaatctc tataaaaaacc cttttcactc aactcacat cactcacata agaactaaaa 480
tctctaaaga gtcgtctctg tttcagggtt agctttctct cccgatctcg ctttcgatct 540
gatctcgtct gatctccgat ttcgatcccc gtccgatctc gatctgatcc catccgatct 600
gtgattgatt cgttgagatt cagatctgat cttaggatct ctctgataga tcatagattc 660
aatctctcga gatagagatg attgatgttg ttcagatcgg ttttgatctc tgatctgatc 720
agctcgattg attcgatttg attctcgatt cgatttgatc gacaattgat ctgattctct 780
aattgatgtt ctgtttttgt tacaggtttt 810

```

<210> 19

<211> 500

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.

<400> 19

```

catagagcag tcttgtctca aaaaaatcga attagcagt tgaaagtgtt cgtcttatca 60
agatgaaaat ctgacaaaaa ttttggttaa atttggtagt atttgataag atatgtacct 120
taaaattgat gtttaataatc ttcttatcca aaaaaagaac caatccattg cagtcttaaa 180
tgaaatatatt caagaaagga ttgagccaaa aaccgtgttt ataaaaatttt caaatccaca 240
atttccacat tcacttggat attacaagtg tggcatctca taaaaaaaaa gaaaaagaaa 300
aaccacgtgg actattatat ccagccacgt ggctttaaaa tcttatccaa aatcacctct 360
catccaacgg ataaggtaac cacacagcct tatccaacca catcacacga atccactcta 420
tatatactcc atataacccat cactcacacg tctttcatca cacaagtaaa acagcatcac 480
taaaagaaaa aaaacaagaa 500

```

<210> 20

<211> 449

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP579.nno:2.

<400> 20

```

catagagcag tcttgtctca aaaaaatcga attagcagt tgaaagtgtt cgtcttatca 60
agatgaaaat ctgacaaaaa ttttggttaa atttggtagt atttgataag atatgtacct 120
taaaattgat gtttaataatc ttcttatcca aaaaaagaac caatccattg cagtcttaaa 180
tgaaatatatt caagaaagga ttgagccaaa aaccgtgttt ataaaaatttt caaatccaca 240
atttccacat tcacttggat attacaagtg tggcatctca taaaaaaaaa gaaaaagaaa 300
aaccacgtgg actattatat ccagccacgt ggctttaaaa tcttatccaa aatcacctct 360
catccaacgg ataaggtaac cacacagcct tatccaacca catcacacga atccactcta 420
tatatactcc atataacccat cactcacac 449

```

<210> 21

<211> 51

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP579.nno:1.

<400> 21

```

gtctttcatc acacaagtaa aacagcatca ctaaaagaaa aaaaacaaga a 51

```

<210> 22

<211> 810

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP579.nno+At.GSI102.nno:3.

<400> 22

catagagcag	tcttgtctca	aaaaaatcga	attaagcagt	tgaaagtgtt	cgtcttatca	60
agatgaaaat	ctgacaaaaa	ttttgttaaa	atttggtagt	atttgataag	atatgtacct	120
taaaattgat	gttaataatc	ttcttatcca	aaaaaagaac	caatccattg	cagtcttaaa	180
tgaaatat	caagaaagga	ttgagccaaa	aaccgtgttt	ataaaatttt	caaatccaca	240
atttccacat	tcacttggat	attacaagtg	tggcatctca	taaaaaaaaa	gaaaaagaaa	300
aaccacgtgg	actattatat	ccagccacgt	ggctttaaaa	tcttatccaa	aatcacctct	360
catccaacgg	ataaggtaac	cacacagcct	tatccaacca	catcacacga	atccactcta	420
tatatactcc	atataacct	cactcacacg	tctttcatca	cacaagtaaa	acagcatcac	480
taaaagaaaa	aaaacaagaa	tttcagggtt	agctttctct	ccgatctcgg	ctttcgatct	540
gatctcgtct	gatctccgat	ttcgatcccc	gtccgatctc	gatctgatcc	catccgatct	600
gtgattgatt	cgttgagatt	cagatctgat	cttaggatct	ctctgataga	tcatagattc	660
aatctctcga	gatagagatg	attgatgttg	ttcagatcgg	ttttgatctc	tgatctgatc	720
agctcgattg	attcgatttg	attctcgatt	cgatttgatc	gacaattgat	ctgattctct	780
aattgatgtt	ctgtttttgt	tacaggtttt				810

<210> 23

<211> 1350

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP571.nno+At.GSP442.nno+At.Cyco:1.

<400> 23

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacaa	aaagtattaa	ttaatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttgtcac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
attgttaatg	ttatccgaac	tagtcataat	tacaaccgac	aaaataagggt	tattttgtgt	480
gttatagaat	tttttggaac	gtttttgttt	tggttttcga	ttgtagtaaa	aatagattta	540
tgtaataaga	tttacttttc	ttgttgaaac	aaaataatct	tagaattaac	tcaactttta	600
tgttagaaca	aatgataaaa	aaatttcccc	ttttctatgc	gattattttc	aatcagagag	660
aaatacatat	aatatatata	attcaaatta	atctgccaaa	ttaataaatt	tggattaaaa	720
tttataaatg	aaacaatggt	gtaaggcaat	taaaaacaca	acactaaaaa	tatgagaaca	780
ttttatctgg	gcattaagag	tttgggcttt	agatctaaaa	taaaggccgg	cccaacgaga	840
atattaaacc	ctaattgacc	tagttcccta	tatatataaa	ccctatattt	ctctcgtcac	900
tcctcaactc	tcagctaaac	cacggaccgc	agtgagtcac	ataaccctct	tggaaagagt	960
ctcaacactt	gcagagaaaa	agaacaagga	agatcccga	aacaggtaat	ttctctctct	1020
tctattttta	ccattttcca	ttgacgaoga	tctaggtttt	ctgatttgat	tttggaagac	1080
gcctcgatga	gtttatagat	tcgtagattg	gttttgagat	tcagtataat	ttcaccggga	1140
ttccaatttt	tgaaccgata	cctaattttg	aattgatttg	gtagatcgat	tgggtcaaat	1200
tgaaattgat	ttttctccat	aatatctgaa	gcgtcttatt	ggatcaaatc	tacaacattt	1260
ctctgttgaa	aggatcgatt	tttttttct	tggaacatga	taacttttga	ttattcatca	1320
aagttttgtt	ctttttaata	tttcacagggt				1350

<210> 24

<211> 422

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự tăng cường tổng hợp, E-At.GSP571.nno:1.

<400> 24

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcacaa	aaagtattaa	ttaatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttgtcac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360

ggaaaatcca accaaccaca tgtaatccca cacctcatca ccttatccac acctctgtct 420
at 422

<210> 25

<211> 902

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khởi đầu dạng khảm tổng hợp, P-At.GSP571/442.

<400> 25

agtacaatca	tacaagagca	atatatatat	ttttggttat	tgaaatttaa	atatcatctt	60
cacaaaatga	aaaagcaca	aaagtattaa	ttaatatcat	gttttgagac	tcctttttac	120
caagaatata	aatttcacac	ctaagaaaat	tctgaactag	gaaaataacc	agcatacaat	180
taaggaataa	gaaaatgcaa	ttacgataaa	cacttgtcac	aaattgttta	ataagtcact	240
atccaatcaa	ttatcaaaaag	taagatattg	ccacgtggca	accagtattt	tcatcacctt	300
atcaaaagat	aagcaaaaaga	accacatcaa	agccacaaaa	tgccaaccac	agatggataa	360
ggaaaatcca	accaaccaca	tgtaatccca	cacctcatca	ccttatccac	acctctgtct	420
attgttaatg	ttatccgaac	tagtcataat	tacaaccgac	aaaataaggt	tattttgtgt	480
gttataagaat	tttttggaac	gtttttgttt	tggttttcga	ttgtagtaaa	aatagattta	540
tgtaataaga	tttacttttc	ttgttgaaac	aaaataatct	tagaattaac	tcaactttta	600
tgttagaaca	aatgataaaa	aaatttcccc	ttttctatgc	gattattttc	aatcagagag	660
aaatacatat	aatatatata	attcaaatta	atctgccaaa	ttaataaatt	tggtattaaa	720
tttataaatg	aaacaatggt	gtaaggcaat	taaaaacaca	acactaaaaa	tatgagaaca	780
ttttatctgg	gcattaagag	tttgggcttt	agatctaaaa	taaaggccgg	cccaacgaga	840
atattaaacc	ctaattgacc	tagttcccta	tatatataaa	ccctatattt	ctctcgtcac	900
tc						902

<210> 26

<211> 800

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.GSI17.nno:3.

<400> 26

aattaaattc	aacacgtttg	ttatatattt	tttattgaaa	ttattcttca	ttcgtctttt	60
aatggataaa	aaggtataat	caagtatatt	ttatacacat	ctttctattt	gtgtgtacca	120
aatgttaaaa	tgccaatttt	tgacaaaaaa	accgcataat	tttcttaatt	tcttaaatat	180
gattaattca	tcaataactt	ggaatttcac	aatacacaaa	agtgggtgta	gttaccgtta	240
ttataattat	acacaacaac	tcattctctc	atagaaagaa	aagaaaaata	aaataagaaa	300
tcaaaaaacg	acaagataac	caatctccac	atcatccacg	tggcgtaagg	ataagggtcac	360
aaccaccact	cagccacgtg	gcagaatott	atccaatcac	tctcaccaca	caaacccttat	420
ccacttctat	atataatctc	ttcttctcat	tatcactcac	cacacatcct	tgcaaaaagta	480
aagagaaaaa	acaaacaaga	caggtaaacc	cagatctctt	tcttctcttc	tcttcatctc	540
gatctctcca	ttttcataaa	cccaattttt	tctctgattt	gtttgatttg	gtttggatct	600
ttctgtgttt	ccatgggttt	aggaatttta	ggatagattt	ttgtttgttc	atgttattca	660
toggatatat	agatttcaaa	ttctttttgca	atttttctct	ctcttttagtt	ttgctcaatt	720
ttggttggtg	ttgtgatgag	tgttctcttt	atgggtttat	ctgagcttgg	tgagagtttt	780
ttgatattga	ttttgcaggt					800

<210> 27

<211> 458

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP576.nno:4.

<400> 27

aattaaattc	aacacgtttg	ttatatattt	tttattgaaa	ttattcttca	ttcgtctttt	60
aatggataaa	aaggtataat	caagtatatt	ttatacacat	ctttctattt	gtgtgtacca	120
aatgttaaaa	tgccaatttt	tgacaaaaaa	accgcataat	tttcttaatt	tcttaaatat	180
gattaattca	tcaataactt	ggaatttcac	aatacacaaa	agtgggtgta	gttaccgtta	240
ttataattat	acacaacaac	tcattctctc	atagaaagaa	aagaaaaata	aaataagaaa	300

tcaaaaaacg acaagataac caatctccac atcatccacg tggcgtaagg ataaggtcac 360
aaccaccact cagccacgtg gcagaatctt atccaatcac tctcaccaca caaaccttat 420
ccacttctat atataatctc ttcttctcat tatcactc 458

<210> 28

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP576.nno:2.

<400> 28

accacacatc cttgcaaaag taaagagaaa aaacaaacaa ga 42

<210> 29

<211> 400

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST59.nno:1.

<400> 29

ttgttttggt tgtaccataa tatatttgct gtgtgtttgc tgccatctca tgtgcagagg 60
aatatataatt ttttcgtggt ttctgtcgtg ctgtactgag gaccgttgta aacatatgaa 120
taaaagtaat aaatttggtt ttgttttcat accccattgg tgggtgctcct ttgggttctcg 180
tttgttgctg gagacagata tgtttggtgtt gtttgtgttc ttgttttatac tggaggcgag 240
cagctttttg tttgggaaga acaaaatcag tttggatgct ttgctccatc ctgtactgtt 300
gtaaactgca tatatatata tatatatgaa taaaactggt ttgttttcat accatgtttg 360
tgtgttctgt tctgttgctc gagacgagga ataaattggt 400

<210> 30

<211> 947

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP221+At.Cyco:3.

<400> 30

gctagcgctt atggagcgtg atggactgaa agagaccctt accacgtgtt gacgtaagca 60
atgacataaa accgatccta atctctccta cgaacgacag cggagagtac tgctgaaagc 120
tatgcttttta tttttcttta tttttctcgt cagtgggaata cacgttttgt cgggtgtgtgt 180
cctttttcaa agaaagacgg aactgcctag gacaacgtcg gctaccaaag cacaatgtaa 240
agtagacatg atgatcgacg acgtcatgca tgacgtttta catgcattgt atgtgtccgt 300
cagctctataa ataggtcaag aacaaacatc gagaaaaggc agaggcgaaa taccatctg 360
cctatctctc aagaaataac tctctcttgt tcttctcctt ttctttcata gtttaaaaac 420
ctgaaattgg gcaagcccca taggcatttt ggtatcagag cgagtaagga caagtaggta 480
agtccctaaa atacttctat caataaaatt tctacgcaa gaaggtaag ttgtacgttt 540
atcctacacc cttgtgtttg taaccaggct tggtaagtg cacaagggtt tttgagtccc 600
aggtaatttc tctcctctct atttttacca ttttccattg acgacgatct aggttttctg 660
atgtgatttt ggagaacgcc tcgatgagtt tatagattcg tagattgggt ttgagattca 720
gtataatttc acccggttcc caatttttga accgatacct aattttgaat tgatttggtt 780
gatcgattgg tcaaatttga aattgatttt tctccataat atctgaagcg tcttattgga 840
tcaaattctac aacatttctc tgttgaaagg atcgattttt tttttcttgg aacatgataa 900
cttttgatta ttcacaaag ttttggttctt ttttaatttt cacaggt 947

<210> 31

<211> 370

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự khởi đầu tổng hợp, P-At.GSP221:3.

<400> 31

gctagcgctt atggagcgtg atggactgaa agagaccctt accacgtgtt gacgtaagca 60
atgacataaa accgatccta atctctccta cgaacgacag cggagagtac tgctgaaagc 120

```
tatgctttta tttttcttta tttttctcgt cagtgggaata cacgttttgt cgggtgtgtgt 180
ccttttccaa agaaagacgg aactgcctag gacaacgtcg gctaccaaag cacaatgtaa 240
agtagacatg atgacgcacg acgtcatgca tgacgtttta catgcattgt atgtgtccgt 300
cagtctataa ataggtcaag aacaaacatc gagaaaaggc agaggcgaaa taccatctg 360
cctatctctc 370
```

<210> 32

<211> 229

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự dẫn đầu tổng hợp, L-At.GSP221:1.

<400> 32

```
aagaaataac tctctcttgt tcttcctcct ttctttcata gtttaaaaac ctgaaattgg 60
gcaagcccca taggcatttt ggtatcagag cgagtaagga caagtaggta agtccctaaa 120
atacttctat caataaaatt tctacgcca gaagggttaag ttgtacgttt atcctacacc 180
cttgtgtttg taaccaggct tgggtcaagt cacaagggtta ttgagttcc 229
```

<210> 33

<211> 348

<212> ADN

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(348)

<223> Intron, I-At.Cyco:2 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Cytochrome c oxidaza từ *Arabidopsis*.

<400> 33

```
caggtaattt ctctcctctc tatttttacc attttccatt gacgacgac taggttttct 60
gatttgattt tggagaacgc ctcgatgagt ttatagattc gtagattggg ttgagattc 120
agtataattt caccgcgatt ccaatttttg aaccgatacc taattttgaa ttgatttggt 180
agatcgattg gtcaaatttg aaattgattt ttctccataa tatctgaagc gtcttattgg 240
atcaaattcta caacatttct ctggtgaaag gatcgatttt ttttttcttg gaacatgata 300
acttttgatt attcatcaaa gttttgttct ttttaattt tcacaggt 348
```

<210> 34

<211> 500

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(500)

<223> 3' UTR, T-Mt.Sali3-2-1:2:1 thu được từ gen Sali3 của *Medicago truncatula*.

<400> 34

```
gagtactctc caacatggac acaccatggg attgtgtaac ataaataatg tgtcgtttgt 60
aatgaatgct cgcaactttt ctagctaatt aagctagagt tgaacttgag ctacttttat 120
gtaccctaaa gaggcacaat ctttgctgtt gatgtactat gatcatgtta taatatgatg 180
aaaatggagt gtgcctcatt ttataatttt tattttcctg agtatatgtt tttagggtta 240
aacaccttat aaaaaaaggc cacttagaat atgaaacatg aacttttgta aaaaagtaga 300
gattaaaatt gaaatcaaaa atttttatag gatcaatatt cgaagaattt ttttagaggg 360
attaaaatta aatatagttt cggactgacc caaggcacia tccgggtccg ctcgggttcg 420
acctgagttc accatgcac tgtcacctta ccattgacac gccctaaaat acattagatc 480
gcagtacaaa ttgagagtta 500
```

<210> 35

<211> 500

<212> ADN

<213> *Medicago truncatula*

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(500)
 <223> 3' UTR, T-Mt.Oxr-1:2:1 thu được từ gen protein oxidoreductaza (OXR) giả định từ *Medicago truncatula*.

<400> 35
 aaatgaatga atcagctttc tcttggtcat aaagaattgt gtggaaatga attgtgtgtt 60
 gctatataca tgagtgtgtt gggtgctgcc ttatgtgttc ttctagggtt attttttctt 120
 ttgcttttgta ataatttggt cgttactatt gtaaacaatg tatttaatga ataataaag 180
 tctaaagtgt gtaatggagg gaagtaaatg taaatccttt cgcaagtgtt ttttttagctt 240
 gaaagtcttt catgcattgg tttggagtac catcataatc cccttaattt ttctagttat 300
 gatttttaggg acaagagaag ttcaaattac actccaatta tgtgctcggg gaaatttaat 360
 tggtagcaga caatacacga aaaagtaaca catttagtat cttactatca tctgcaaatc 420
 gtgcatatgt tcatatcatt tcacattttt ataattccagc atattataaa ttcaaacctc 480
 attttggtac ataatagtat 500

<210> 36
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Gossypium barbadense*

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(315)
 <223> 3' UTR, T-Gb.FbL2:1 thu được từ gen *Gossypium barbadense* FbLate-2.

<400> 36
 accatagac actggtgcat gtgccatcat catgcagtaa tttcatggta tatcttaatt 60
 atatggttaa taaaaaaaag atggtgagtg aataatgtgc gtgcattcct ccatgcacca 120
 atggtgaatc tctttgcata catagagatt ctgaatgatt atagtttatg ttgtagtga 180
 attaattttg aatgttgttt tttaaatttta atgtcacttg gcttgattta tgttttaacg 240
 aagcttatgt tatgtatttt actttaatga tattgcatgt attgttaatt taacattgct 300
 tgatcagtat actct 315

<210> 37
 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Medicago truncatula*

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(500)
 <223> 3' UTR, T-Mt.RD22-1:2:1 thu được từ gen protein RD22 khử nước-đáp ứng từ *Medicago truncatula*.

<400> 37
 aaacaccaat tccatcttct tcaataataa ccactatata tatatagaag caacttcaaa 60
 aataacttaat acttgatta taaattgagt tactttgaat gtcctacgat agagacggag 120
 ttcaaacttc ctcaagtatg gttgaaaaat ggtcttcaat gtaactttaa ataaaaactt 180
 tgtacgtcct cgctaataaa aataatgttt gtttaattac tttatatatg ttttttttaa 240
 tgctatttta tatatgttgt accccaaact tgtctgacca atttaatcag aagaacatgt 300
 agagtgtagg tttgccggga agatttgat taaagtcttc gtttggttg gtttggtctt 360
 ggtcatgccg gaaaatttat tttccttgta cttcaaatgt tttgcttttt cgatcgga 420
 gggaatagga gattaaaggg cctcctttta atatggcaaa cagaattata gcttttagact 480
 gacgctgcgg tttagcttca 500

<210> 38
 <211> 1204
 <212> ADN
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(1204)

<223> EXP-At.Cyco:1:1, thu được từ gen VIa dưới đơn vị Cytochrome c oxidaza từ Arabidopsis.

<400> 38

tgcgagtggg	cgaattccgg	agcactctga	ttggctgaaa	aaatagaaat	agtagtgatg	60
ttgctcctcc	tctcctcctc	tattattaat	ttttcgctgt	tcttcttctg	aaagttgtgt	120
ggtttttaga	ggtcaccaa	aaaaatctat	tttgagatac	taaaaatatt	tcgttttgca	180
ttttgttggt	cagccatttg	ttacacaggt	tgaagcttat	aactgaaaat	tggtattcaaa	240
gaatcgtaga	tgaagaaatc	gaagtgaagt	gaatatattc	tgaacatatg	aaaattggaa	300
caagtttttt	ctcattttgc	tagtttctctg	tttttatgtt	ttcttgactt	taggagatga	360
catatggagg	tgaactatac	aaaggttggt	gcaacgataa	cattctcctt	aattcagttt	420
ttgcaactcg	gttacaagca	ctcagtgagc	ttttggccaa	gacaattttt	tttttttttt	480
tctctctctc	taaaatgtta	tagatacgaa	tcctttgttg	aataaaggaa	aaagttgaac	540
atgttgattac	acataagact	ttacataaat	ccaacttttt	tttatatgaa	gctacaaaca	600
agatttataaa	catcaaagat	tccatctaaa	cttcattcat	cttcaatctt	caacatcctt	660
caatgactag	tatgtatgta	cataagtaaa	attggtgata	agaaaacaaa	acaatgatgg	720
gctaaaaatag	cccataaaaag	gcccatataa	cttgggttta	gacttttagat	tcaacgacgc	780
cagatttagtg	agtcacataa	cctctcttga	aagagtctca	acacttgacg	agaaaaagaa	840
caaggaagat	cccggaaaca	ggtaattttct	ctcctctcta	tttttaccat	tttccattga	900
cgacgatcta	ggttttctga	tttgattttg	gagaacgcct	cgatgagttt	atagattcgt	960
agattgggttt	tgagattcag	tataatttca	cccgatttcc	aatttttgaa	ccgataccta	1020
atgtttgaatt	gatttggtag	atcgattggg	caaatttgaa	attgattttt	ctccataata	1080
tctgaagcgt	cttattggat	caaatctaca	acatttctct	gttgaaagga	tcgatttttt	1140
ttttcttgga	acatgataac	ttttgattat	tcacaaagt	tttgttcttt	ttaatatttc	1200
acag						1204

<210> 39

<211> 786

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(786)

<223> Trình tự khởi đầu, P-At.Cyco-1:1:2 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Cytochrome c oxidaza từ Arabidopsis.

<400> 39

tgcgagtggg	cgaattccgg	agcactctga	ttggctgaaa	aaatagaaat	agtagtgatg	60
ttgctcctcc	tctcctcctc	tattattaat	ttttcgctgt	tcttcttctg	aaagttgtgt	120
ggtttttaga	ggtcaccaa	aaaaatctat	tttgagatac	taaaaatatt	tcgttttgca	180
ttttgttggt	cagccatttg	ttacacaggt	tgaagcttat	aactgaaaat	tggtattcaaa	240
gaatcgtaga	tgaagaaatc	gaagtgaagt	gaatatattc	tgaacatatg	aaaattggaa	300
caagtttttt	ctcattttgc	tagtttctctg	tttttatgtt	ttcttgactt	taggagatga	360
catatggagg	tgaactatac	aaaggttggt	gcaacgataa	cattctcctt	aattcagttt	420
ttgcaactcg	gttacaagca	ctcagtgagc	ttttggccaa	gacaattttt	tttttttttt	480
tctctctctc	taaaatgtta	tagatacgaa	tcctttgttg	aataaaggaa	aaagttgaac	540
atgttgattac	acataagact	ttacataaat	ccaacttttt	tttatatgaa	gctacaaaca	600
agatttataaa	catcaaagat	tccatctaaa	cttcattcat	cttcaatctt	caacatcctt	660
caatgactag	tatgtatgta	cataagtaaa	attggtgata	agaaaacaaa	acaatgatgg	720
gctaaaaatag	cccataaaaag	gcccatataa	cttgggttta	gacttttagat	tcaacgacgc	780
cagatt						786

<210> 40

<211> 72

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(72)

<223> Trình tự dẫn đầu, L-At.Cyco-1:1:2 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Cytochrome c oxidaza từ Arabidopsis.

<400> 40

agtgagtcac ataaccctct tggaaagagt ctcaacactt gcagagaaaa agaacaagga 60
agatccccgga aa 72

<210> 41

<211> 346

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(346)

<223> Intron, I-At.Cyco-1:1:1 thu được từ gen VIa dưới đơn vị Cytochrome c oxidaza từ Arabidopsis.

<400> 41

caggtaattt ctctcctctc tattttttacc attttccatt gacgacgac taggtttttct 60
gatttgattt tggagaacgc ctcgatgagt ttatagattc gtagattggg tttgagattc 120
agtataattt caccgcgatt ccaatttttg aaccgatacc taattttgaa ttgatttggt 180
agatcgattg gtcaaatttg aaattgattt ttctccataa tatctgaagc gtcttatttg 240
atcaaactca caacatttct ctgttgaaag gatcgatttt ttttttcttg gaacatgata 300
acttttgatt attcatcaaa gttttgttct ttttaattatt tcacag 346

<210> 42

<211> 2001

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mã hóa đối với beta-glucuronidaza (GUS) với intron có thể xử lý thu được từ gen ST-LS1 đặc hiệu mô cảm ứng ánh sáng của khoai tây (số truy cập Genbank: X04753).

<400> 42

atgggtccgct ctgtagaaac cccaaccggt gaaatcaaaa aactcgacgg cctgtgggca 60
ttcagtcctgg atcgcgaaaa ctgtggaatt gatcagcggt ggtgggaaag cgcggttacia 120
gaaagccggg caattgctgt gccaggcagt tttaacgac agttcgccga tgcagatatt 180
cgtaattatg cgggcaacgt ctggtatcag cgcgaagtct ttataccgaa aggttgggca 240
ggccagcgta ctgtgctgctg ttctgatgag gtcactcatt acggcaaaagt gtgggtcaat 300
aatcaggaag tgatggagca tcagggcggc tatacgccat ttgaagccga tgtcacgccc 360
tatgttattg ccgggaaaag tgtacgtaag tttctgcttc tacctttgat atatatataa 420
taattatcat taattagtag taatataata tttcaaatat ttttttcaaa ataaaagaat 480
gtagtatata gcaattgctt ttctgtagtt tataagtgtg tataattttaa tttataactt 540
ttctaataata tgaccaaact ttgttgatgt gcaggtatca ccgtttgtgt gaacaacgaa 600
ctgaactggc agactatccc gccgggaatg gtgattaccg acgaaaacgg caagaaaaag 660
cagtccttact tccatgattt ctttaactat gccggaatcc atcgacgagc aatgctctac 720
accacgcccga acacctgggt ggacgatata accgtggtga cgcagtcgca gcaagactgt 780
aaccacgctg ctgttgactg gcaggtggtg gccaatggtg atgtcagcgt tgaactgcgt 840
gatgcggatc aacaggtggt tgcaactgga caaggcacta gcgggacttt gcaagtgggt 900
aatccgcacc tctggcaacc ggggtgaagg tttctctatg aactgtgcgt cacagccaaa 960
agccagacag agtgtgatat ctacccgctt cgcgtcggca tccggtcagt ggcagtgaag 1020
ggcgaacagt tcctgattaa ccacaaacgg ttctacttta ctggctttgg tcgtcatgaa 1080
gatgcggact tgcgtggcaa aggattcgat aacgtgctga tgggtgcaga ccacgcatta 1140
atggactgga ttggggccaa ctctaccggt acctcgcat acccttacgc tgaagagatg 1200
ctcgactggg cagatgaaca tggcatcggt gtgattgatg aaactgctgc tgtcggcttt 1260
aacctctctt taggcattgg tttcgaagcg ggcaacaagc cgaaagaact gtacagcgaa 1320
gaggcagtc aacgggaaac tcagcaagcg cacttacagg cgattaaaga gctgatagcg 1380
cgtgacaaaa accaccaag cgtggtgatg tggagtattg ccaacgaacc ggatacccg 1440
ccgcaagggt cacgggaata tttcgcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg 1500
acgcgtccga tcacctgct caatgtaatg ttctgcgacg ctacacccga taccatcagc 1560

```

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

```

<210> 43

<211> 928

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP442+L-I-At.Cyco.

<400> 43

```

tgtaaattgt atccgaacta gtcataatta caaccgacaa aataaggtta ttttgtgtgt 60
tatagaattt tttggacagt ttttgttttg gttttcgatt gtagtaaaaa tagatttatg 120
taataagatt tacttttctt gttgaaacaa aataatctta gaattaactc aacttttatg 180
ttagaacaaa tgataaaaaa atttcccctt ttctatgcga ttattttcaa tcagagagaa 240
atacatataa tatatataat tcaaattaat ctgccaaaatt aataaatttg gattaaaatt 300
tataaatgaa acaatggtgt aaggcaatta aaaacacaac actaaaaata tgagaacatt 360
ttatctgggc attaagagtt tgggcttttag atctaaaata aaggccggcc caacgagaat 420
attaaaccct aattgacctt gttccctata tatataaacc ctatatcttct ctcgtcactc 480
ctcaactctc agctaaacca cggaccgcag tgagtcacat aaccctcttg gaaagagtct 540
caacacttgc agagaaaaag aacaaggaag atcccggaaa caggtaattt ctctcctctc 600
tatttttacc attttccatt gacgacgatc taggttttct gatttgattt tggagaacgc 660
ctcgatgagt ttatagattc gtagattggg tttgagattc agtataattt caccgggatt 720
ccaatttttg aaccgatacc taattttgaa ttgatttggg agatcgattg gtcaaatttg 780
aaattgattt ttctccataa tatctgaagc gtcttattgg atcaaatcta caacatttct 840
ctgttgaaag gatcgatttt ttttttcttg gaacatgata acttttgatt attcatcaaa 900
gttttgttct ttttaatat tccacaggt 928

```

<210> 44

<211> 300

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> 3' UTR tổng hợp, T-Zm.GST7.nno:2.

<400> 44

```

atgtctgctg cggcggcctt cacagtttgt ttatttccta ctgtttgctg cggcgattgt 60
tgttgttttc tgttttataa ataataaagg aggaggagat ttgttttggg ttgtgtttgt 120
ttocatcctt gctgctccat cacactatct gtaatttgta aacagcgaca ataaataaat 180
taataaattt ggtttctcat acctatatgt gtctgtttgg aggcttgttt gtttgagaca 240
tctgtctggg tgtttttttg ctgccagccg gtagtataaa ttttgttttt ggacgacgaa 300

```

<210> 45

<211> 855

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> EXP tổng hợp, EXP-At.GSP576.nno+At.Cyco:1.

<400> 45

```

aattaaattc aacacgtttg ttatatattt tttattgaaa ttattcttca ttcgtctttt 60
aatggataaaa aaggtataat caagtatatt ttatacacat ctttctattt gtgtgtacca 120
aatgttaaaa tggccaattt tgaccaaaaa accgcataat tttcttaatt tcttaaatat 180
gattaattca tcaataactt ggaatttcac aatacacaaa agtgggtgta gttaccgtta 240
ttatatattt acacaacaac tcatctcctc atagaaagaa aagaaaaata aaataagaaa 300
tcaaaaaacg acaagataac caatctccac atcatccacg tggcgtaagg ataaggtcac 360
aaccaccact cagccacgtg gcagaatctt atccaatcac tctcaccaca caaaccttat 420
ccacttctat atataatctc ttcttctcat tatcactcac cacacatcct tgcaaaagta 480

```

```

aagagaaaaa acaaacaaga cggaccgcag gtaattttctc tctctctctat ttttaccatt      540
ttccattgac gacgatctag gttttctgat ttgatttttg agaacgcctc gatgagttta      600
tagattcgta gattgggttt gagattcagt ataatttcac ccggattcca atttttgaac      660
cgatacctaa ttttgaattg atttggtaga tcgattggtc aaatttgaaa ttgatttttc      720
tccataatat ctgaagcgtc ttattggatc aaatctacaa catttctctg ttgaaaggat      780
cgattttttt tttcttggaa catgataact tttgattatt catcaaagtt ttgttctttt      840
taatatttca caggt                                     855

```

<210> 46
 <211> 835
 <212> ADN
 <213> virus khảm súp lơ

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(835)
 <223> Trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S bao gồm trình tự dẫn đầu và trình tự khởi đầu 35S thu được từ virus khảm súp lơ.

```

<400> 46
agattagcct tttcaatttc agaaagaatg ctaaccacac gatgggttaga gaggcttacg      60
cagcaggtct catcaagacg atctaccgca gcaataatct ccaggaaatc aaataccttc      120
ccaagaaggt taaagatgca gtcaaaagat tcaggactaa ctgcatcaag aacacagaga      180
aagatatatt tctcaagatc agaagtacta ttccagtatg gacgattcaa ggcttgcttc      240
acaaaccaag gcaagtaata gagattggag tctctaaaaa ggtagttccc actgaatcaa      300
aggccatgga gtcaaagatt caaatagagg acctaacaga actcgccgta aagactggcg      360
aacagttcat acagagtctc ttacgactca atgacaagaa gaaaatcttc gtcaacatgg      420
tgagcagcga cacacttgct tactccaaaa atatcaaaga tacagtctca gaagaccaa      480
gggcaattga gacttttcaa caaagggtta tatccggaaa cctcctcgga ttccattgcc      540
cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc tacaatgcc      600
atcattgcga taaaggaaaag gccatcggtg aagatgcctc tgccgacagt ggtcccaaag      660
atggaccccc acccagagg agcatcggtg aaaaagaaga cgttccaacc acgtcttcaa      720
agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa tcccactatc      780
cttcgcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagagg acacg      835

```

<210> 47
 <211> 804
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(804)
 <223> Trình tự ADN của intron, I-Zm.DnaK:1, thu được từ gen protein sốc nhiệt 70 (Hsp70) (DnaK) từ ngô.

```

<400> 47
accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa      60
tgctctcttg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa      120
atcgtgttct gcctgtgctg attacttgcc gtccctttgta gcagcaaaat atagggacat      180
ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta atttggtgct      240
tagcggatatt tatttaagca catgttggtg ttatagggca cttggattca gaagtttgct      300
gttaatttag gcacaggctt catactacat ggggtcaatag tatagggtt catattatag      360
gcgatactat aataatttgt tcgtctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc      420
tattctgttt ttgtttgtgt gctgttaaatt tgttaacgcc tgaaggaata aatataaatg      480
acgaaatttt gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca      540
cttgttttta atattgttgt ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgatc      600
tgcttggttg ttgtaacaaa atttaaaaaa aaagagtttc ctttttggtg ctctccttac      660
ctcctgatgg tatctagtat ctaccaactg acaatatatt gcttctcttt acatacgtat      720
cttgctcgat gccttctccc tagtgttgac cagtgttact cacatagtct ttgctcattt      780
cattgtaatg cagataccaa gcgg                                     804

```

<210> 48

<211> 300
 <212> ADN
 <213> *Orzya sativa*

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(300)
 <223> Trình tự ADN của 3' UTR, T-Os.LTP:1, thu được từ gen giống protein vận chuyển lipid (LTP) từ lúa.

<400> 48
 attaatcgat cctccgatcc cttaattacc ataccattac accatgcac aatatccata 60
 tatatataaa cccctttcgca cgtacttata ctatgttttg tcatacatat atatgtgtcg 120
 aacgatcgat ctatcactga tatgatatga ttgatccatc agcctgatct ctgtatcttg 180
 ttatttgtat accgtcaaat aaaagtttct tccacttggt ttaataatta gctactctca 240
 tctcatgaac cctatatata actagtttaa ttgtctgtca attgaacatg atgatcgatg 300

<210> 49
 <211> 516
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mã hóa đối với protein luciferaza huỳnh quang được thao tác di truyền.

<400> 49
 atggtcttca cactcgaaga tttcgttggg gactggcgac agacagccgg ctacaacctg 60
 gaccaagtcc ttgaacaggg aggtgtgtcc agtttgtttc agaatctcgg ggtgtccgta 120
 actccgatcc aaaggattgt cctgagcggg gaaaatgggc tgaagatcga catccatgtc 180
 atcatcccgat atgaaggtct gagcggcgac caaatgggac agatcgaaaa aatttttaag 240
 gtggtgtacc ctgtggatga tcactcacttt aaggtgatcc tgcactatgg cacactggta 300
 atcgacgggg ttacgccgaa catgatcgac tatttcggac ggccgtatga aggcacgcc 360
 gtgttcgacg gcaaaaagat cactgtaaca gggaccctgt ggaacggcaa caaaattatc 420
 gacgagcgcc tgatcaaccc cgaaggctcc ctgctgttcc gagtaaccat caacggagtg 480
 accggctggc ggctgtgcga acgcattctg gcgtaa 516

<210> 50
 <211> 1848
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự ADN của EXP, EXP-At.Bglu21+At.Cyco:2 bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu của gen beta-glucuronidaza 21 từ *Arabidopsis thaliana*, được liên kết theo kiểu hoạt động 5' với intron, I-At.Cyco-1:1:1.

<400> 50
 aaataaattt cttaaagtgt gtgttttaaat ctaaaacatc atataatttg aaatagagga 60
 aatatcatct aataaagtaa tggatatatt gtatagttaa tgatttgtct ttttattcgc 120
 gcaaaatgtg tcaattataa aatataaaga ggatataatt tagtttagag ttttagacac 180
 gaggactata tattggaaaa caaaaaagta atgtaaacca tatagatcat ggaatgagtc 240
 atcctattaa acagttgtat tatatatatta tatttttagtc actaacacat taataactta 300
 acgtccataa caaaaataaga tccaaaactc gatctagatc tatacgaggc actaaatgat 360
 ccattgactt agggccggcc gattgggttcg aggactcctc atgctgtaaa cttttttttt 420
 ggacatacat gatataattt taagtcacgt ttttatatta tatgttccac gcccaatata 480
 atatgttcca aactaggaaa aataagtaag aattagtcaa tgatcgagat aatgcaatga 540
 atcatcctat ttattaaata gatttactaa actatatata atacaatgat cgagatcgtg 600
 ccatgaagca tcctatatac tataaaaata gtcttactaa atacatactc atatagttaa 660
 gtcattcatt agtccaaaca ttaaagtaga gatcctttac ttgctacctg aattttttca 720
 gaataaggta taactttttt tcgaattaga aactgattta tgaagatta agagtaatgt 780
 tcgttaaaca agttaaataa tatgttttta caattaagtt ttgaaaaata ataaagtctc 840
 caattatttg agtatcaaaa ataggttgtt tattatttag ggttttcgtt ggtttaaatg 900
 caacgggggtg tgggtgtcat tgtggaagtt aatggaagta attggttgag gttttaaacg 960
 ttatcggaca ttttaaatga ctggttttaca gttaaaaata tgtgtattta cggcaatttt 1020
 atgattggct tagcagtaga tgcgacagtg gtttaaacca aaaattacca aataaataat 1080

```

atacaatttat taaatttatat aaaacaccaa tattatatat ttatatatat atgaacatag 1140
ttaattatcg aaaccataga caaagtacat aagagttatt ccgaaaaagg tttattatga 1200
aacacaaata atcatattgg gagattatga tatccaaaat ggactaatca aataattaaa 1260
tccaaaatgg atgaagaact tatattagtt ccacgcacaa tataatatgt tccaaactaa 1320
gtaagaacac aacggtcgag gtcattgcaat gaatcatcct atatataaaa tagttttact 1380
aaacaatttat attttagtca ctcgttaaca aacaatcaaa atcgctatat aaagaactcc 1440
gattggatgt aaacaaatca tcataaaactt gttctcttcc agaagaaact aaaaacaaaa 1500
caggtaattt ctctcctctc tatttttacc attttccatt gacgacgatc taggttttct 1560
gatttgattt tggagaacgc ctcgatgagt ttatagattc gtagattggg tttgagattc 1620
agtataattt caccoggatt ccaatttttg aaccgatacc taattttgaa ttgatttggt 1680
agatcgattg gtcaaatttg aaattgattt ttctccataa tatctgaagc gtcttattgg 1740
atcaaactca caacatttct ctgttgaaag gatcgatttt ttttttcttg gaacatgata 1800
acttttgatt attcatcaaa gttttgttct ttttaatat tccacaggt 1848

```

<210> 51

<211> 712

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Ph.DnaK:1:3 bao gồm trình tự khởi đầu virus khảm súp lơ 35S được tăng cường, được liên kết theo kiểu hoạt động 5' với trình tự dẫn đầu của gen protein sốc nhiệt 70 (HSP70) từ cây thuốc lá cảnh.

<400> 51

```

gggccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg 60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaaaag gaagggtggct cctacaaatg 120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa 180
agatggacc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc 240
aaagcaagt gattgatgtg atggtccgat tgagactttt caacaaaggg taatatccgg 300
aaacctcctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttt attgtgaaga tagtgaaaaa 360
ggaagggtgc tcctacaaat gccatcattg cgataaagga aaggccatcg ttgaagatgc 420
ctctgccgac agtgggtcca aagatggacc cccaccacg aggagcatcg tggaaaaaga 480
agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt gatctctcca ctgacgtaag 540
ggatgacgca caatcccact atccttcgca agacccttc tctatataag gaagttcatt 600
tcatttgag aggacactct agacagaaaa atttgctaca ttgtttcaca aacttcaaat 660
attattcatt tatttgcag ctttcaaact ctttgtttct tgtttgttga tt 712

```

<210> 52

<211> 841

<212> ADN

<213> Glycine max

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(841)

<223> Trình tự ADN của EXP, EXP-Gm.Sphas1:1:1 bao gồm trình tự khởi đầu và trình tự dẫn đầu của gen 7S alpha đầu tiên của đậu tương.

<400> 52

```

ggcaaaaaca tttaatacgt attattttaag aaaaaaatat gtaataatat atttatattt 60
taatatctat tcttatgtat tttttaaaaa tctattatat attgatcaac taaaatattt 120
ttatatctac acttattttg cattttttatc aattttcttg cgttttttgg catattttaat 180
aatgactatt ctttaataat caatcattat tcttacatgg tacatattgt tggaaccata 240
tgaagtgtcc attgcatttg actatgtgga tagtgttttg atccaggcct ccatttgccg 300
cttattaatt aatttggtta cagtccgtac taatcagtta cttatccttc ctccatcata 360
attaatcttg gtagtctcga atgccacaac actgactagt ctcttgatc ataagaaaaa 420
gccaaggaac aaaagaagac aaaacacaaat gagagtatcc tttgcatagc aatgtctaag 480
ttcataaaat tcaaacaaaa acgcaatcac acacagtggg catcacttat ccactagctg 540
atcaggatcg ccgctcaag aaaaaaaaac tggaccccaa aagccatgca caacaacacg 600
tactcacaaa ggtgtcaatc gagcagccca aaacattcac caactcaacc catcatgagc 660
ccacacattt gttgttttcta acccaacctc aaactcgtat tctcttccgc cactcattt 720
ttgtttattt caacaccgt caaactgcat gccacccgt ggccaaatgt ccatgcatgt 780

```

taacaagacc tatgactata aatatctgca atctcggccc aggttttcat catcaagaac 840
c 841

<210> 53

<211> 1446

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S-enh+Zm.DnaK:1:1 bao gồm trình tự khởi đầu virut khảm của súp lơ 35S được tăng cường, được liên kết theo kiểu hoạt động 5' với intron, I-Zm.DnaK:1.

<400> 53

```

gggtccgattg agacttttca acaaagggtg atatccggaa acctcctcgg attccattgc 60
ccagctatct gtcactttat tgtgaagata gtggaaaagg aaggtggctc ctacaaatgc 120
catcattgag ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tgggtcccaa 180
gatggacccc caccacagag gagcatcggt gaaaaagaag acgttccaac cagctcttca 240
aagcaagtgg attgatgtga tgggtccgatt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga 300
aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagg 360
gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc 420
tctgccgaca gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa 480
gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg 540
gatgacgcac aatcccaacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt 600
catttgagaga ggacacgctg acaagctgac tctagcagat ctaccgtctt cggtagcgcg 660
tcaactccgc ctctgccttt gttactgcca cgtttctctg aatgctctct tgtgtggtga 720
ttgctgagag tggtttagct ggatctagaa ttacactctg aaatcggtgt ctgcctgtgc 780
tgattacttg ccgtcctttg tagcagcaaa atatagggac atggtagtag gaaacgaaga 840
tagaacctac acagcaatac gagaaatgtg taatttgggt cttagcggta tttattttaag 900
cacatgtttg tgttataggg cacttggatt cagaagtgtt ctgttaattt aggcacaggc 960
ttcatactac atgggtcaat agtataggga ttcataattt aggcgatact ataataattt 1020
gttcgtctgc agagcttatt atttgccaaa attagatatt cctattctgt ttttgtttgt 1080
gtgctgttaa attgttaacg cctgaaggaa taaatataaa tgacgaaatt ttgatgttta 1140
tctctgctcc tttattgtga ccataagtca agatcagatg cacttgtttt aaatattggt 1200
gtctgaagaa ataagtactg acagtatttt gatgcattga tctgcttggt tgttgtaaca 1260
aaattttaaaa ataaagagtt tcctttttgt tgctctcctt acctcctgat ggtatctagt 1320
atctaccaac tgacactata ttgcttctct ttacatacgt atcttgctcg atgccttctc 1380
cctagtgttg accagtgtta ctacacatagt ctttgctcat ttcattgtaa tgcagatacc 1440
aagcgg 1446

```

<210> 54

<211> 1653

<212> ADN

<213> Photinus pyralis

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(1653)

<223> Trình tự ADN mã hóa protein luciferaza thu được từ đom đóm.

<400> 54

```

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcgccat tctatcctct agaggatgga 60
accgttgag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc tggaaacaatt 120
gcttttacag atgcacatat cgagggtgaac atcacgtacg cggaatactt cgaaatgtcc 180
gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggctgaata caaatcacag aatcgctgta 240
tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgtttg gcgcgttatt tatcggagtt 300
gcagttgogc ccgcgaacga catttataat gaacgtgaat tgctcaacag tatgaacatt 360
tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaacgtgcaa 420
aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga ttaccaggga 480
tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacctc ccggttttaa tgaatacgat 540
tttgtaccag agtcctttga tcgtgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttcctctgga 600
tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
catgccagag atcctatttt tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat tttaaagtgt 720
gttccattcc atcacgggtt tggaatgttt actacactcg gatatttgat atgtggattt 780

```

```

cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac      840
aaaaattcaaa gtgcgttgct agtaccaacc ctattttcat tcttcgccaa aagcactctg      900
attgacaaat acgattttatc taattttacac gaaattgctt ctggggggcg acctcttttcg      960
aaagaagtcg gggaagcggg tgcaaaacgc ttccatcttc cagggatacg acaaggatat     1020
gggctcactg agactacatc agctattctg attacacccg aggggggatga taaaccggggc     1080
gcggtcggta aagttgttcc attttttgaa gcgaagggtg tggatctgga taccgggaaa     1140
acgctggggc ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggg     1200
tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct     1260
ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct     1320
ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgat attgttacia     1380
caccccaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggatgaactt     1440
cccgccgccc ttgttgtttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga gatcgtggat     1500
tacgtcgcca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagttgt gtttgtggac     1560
gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga gatcctcata     1620
aaggccaaga agggcggaaa gtccaaattg taa                                1653

```

<210> 55
 <211> 253
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*

<220>
 <221> đặc điểm hỗn tạp
 <222> (1)..(253)
 <223> Trình tự ADN của 3' UTR, T-AGRtu.nos-1:1:13 thu được từ
 Gen *Agrobacterium tumefaciens* nopalín synthaza.
 <400> 55
 gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gtttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcg cgtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 56
 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo
 <220>
 <223> Trình tự ADN của EXP, EXP-CaMV.35S-enh-Lhcb1 bao gồm trình tự khởi đầu
 virus khảm của súp lơ 35S được tăng cường, được liên kết theo kiểu hoạt động
 5' với trình tự dẫn đầu của gen gắn kết chất diệp lục a/b của phức hợp lúa mì
 tập hợp ánh sáng.

```

<400> 56
gggtccgatgt gagacttttc aacaaagggt aatatccgga aacctcctcg gattccattg      60
cccagctatc tgtcacttta ttgtgaagat agtggaagag gaaggtggct cctacaaatg      120
ccatcattgc gataaaggaa aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtgggtcccaa      180
agatggaccc ccacccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc      240
aaagcaagtg gattgatgtg atggtccgat gtgagacttt tcaacaaagg gtaatatccg      300
gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt tattgtgaag atagtggaaa      360
aggaaggtgg ctctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggccatc gttgaagatg      420
cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggagcatc gtggaaaaag      480
aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc actgacgtaa      540
gggatgacgc acaatcccac tatecttcgc aagacccttc ctctatataa ggaagttcat      600
ttcatttggg gaggaaccat cttccacaca ctcaagccac actattggag aacacacagg      660
gacaacacac cataa                                675

```

<210> 57
 <211> 936
 <212> ADN
 <213> *Renilla reniformis*

<220>

<221> đặc điểm hỗn tạp

<222> (1)..(936)

<223> Trình tự ADN mã hóa protein luciferaza thu được từ Sea Pansey.

<400> 57

atggcttcca	aggtgtacga	ccccgagcaa	cgcaaacgca	tgatcactgg	gcctcagtgg	60
tgggctcgct	gcaagcaaat	gaacgtgctg	gactccttca	tcaactacta	tgattccgag	120
aagcacgccg	agaacgccgt	gatttttctg	catggtaacg	ctgcctccag	ctacctgtgg	180
aggcacgtcg	tgccctcacat	cgagcccgtg	gctagatgca	tcattccctga	tctgatcggg	240
atgggtaagt	ccggcaagag	cggaatggc	tcatatcgcc	tcctggatca	ctacaagtac	300
ctcaccgctt	ggttcgagct	gctgaacctt	ccaaagaaaa	tcattcttgt	gggccacgac	360
tggggggctt	gtctggcctt	tcactactcc	tacgagcacc	aagacaagat	caaggccatc	420
gtccatgctg	agagtgtcgt	ggacgtgatc	gagtcctggg	acgagtggcc	tgacatcgag	480
gaggatatcg	ccctgatcaa	gagcgaagag	ggcgagaaaa	tggtgcttga	gaataacttc	540
ttcgtcgaga	ccatgctccc	aagcaagatc	atgcggaaac	tgagagcctga	ggagttcgct	600
gcctacctgg	agccattcaa	ggagaagggc	gaggttagac	ggcctaccct	ctcctggcct	660
cgcgagatcc	ctctcggtta	gggaggcaag	cccgaacgtg	tccagattgt	ccgcaactac	720
aacgcctacc	ttcggggccag	cgacgatctg	cctaagatgt	tcacgcagtc	cgaccctggg	780
ttctttttcca	acgctattgt	cgagggagct	aagaagttcc	ctaaccaccga	gttcgtgaag	840
gtgaaggggc	tccacttcag	ccaggaggac	gctccagatg	aaatgggtaa	gtacatcaag	900
agcttcgtgg	agcgcgtgct	gaagaacgag	cagtaa			936