



(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) 
1-0019555

(51)⁷ **C12N 15/29, 15/54, 15/81, 15/82, 5/14, (13) B**
A01H 4/00, 5/00

(21) 1-2011-00649

(22) 10.08.2009

(86) PCT/IN2009/000444 10.08.2009

(87) WO2010/018598 18.02.2010

(30) 1896/DEL/2008 11.08.2008 IN

(45) 27.08.2018 365

(43) 27.06.2011 279

(73) PAREEK, Ashwani (IN)

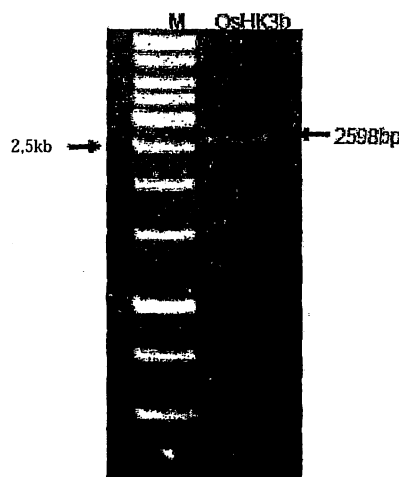
An Indian National of Stress Physiology and Molecular Biology Lab, School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University [JNU] New Delhi 110067, India

(72) PAREEK, Ashwani (IN), KARAN, Ratna (IN), ROY, Gautam Kumar (IN), SINGLA-PAREEK, Sneha Lata (IN)

(74) Công ty TNHH Dương và Trần (DUONG & TRAN CO., LTD)

(54) **PHƯƠNG PHÁP NHÂN DÒNG GEN KINAZA HISTIDIN DẠNG LAI VÀ VECTƠ BIỂU HIỆN CHỨA GEN KINAZA HISTIDIN DẠNG LAI NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64, và có khả năng miễn cảm với thối thâu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và vì thế nó có khả năng chịu được các yếu tố bất lợi khác nhau trong cây trồng mùa vụ; thậm chí trong các thể hệ tiếp sau để tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu với nhiều điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường, và do đó, làm tăng giá trị kinh tế của các cây trồng mùa vụ trong khi vẫn duy trì được sản lượng của cây trồng. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập gen kinaza histidin dạng lai từ giống lúa indica IR64, và các đặc tính chức năng của gen này, trình tự và quá trình nhân dòng, ít nhất, trong vectơ biểu hiện của nấm men và vectơ biểu hiện của thực vật, và các dòng được tạo ra quá trình này, và phương pháp cải thiện sự chống chịu được nhiều yếu tố bất lợi đối với cây trồng mùa vụ cũng như cây trồng mùa vụ có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64, và các dòng được tạo ra từ gen này.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64 mà cho thấy là có khả năng miễn cảm với thâm thấu và được cảm ứng bởi nhiều điều kiện bất lợi đa dạng, và cho thấy là có khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau đối với cây trồng mùa vụ theo cách mà các cây trồng mùa vụ được tạo ra theo cách đó có khả năng chống chịu với nhiều điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường, và bằng cách đó các cây trồng mùa vụ này cho thấy có khả năng tăng giá trị kinh tế trong khi duy trì được sản lượng của cây trồng.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân lập gen kinaza histidin dạng lai từ giống lúa indica IR64, và danh mục trình tự và phương pháp nhân dòng của gen này, ít nhất, trong vector biểu hiện của nấm men và vector biểu hiện của thực vật.

Sáng chế cũng đề cập đến các dòng vô tính được tạo ra bởi quá trình nhân dòng của gen kinaza histidin dạng lai, được phân lập từ giống lúa indica IR64, trong vector biểu hiện của nấm men và vector biểu hiện của thực vật.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ bằng cách sử dụng gen kinaza histidin dạng lai, được phân lập từ giống lúa indica IR64, và các cây trồng mùa vụ có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng gen kinaza histidin dạng lai, được phân lập từ giống lúa indica IR64, cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong cây trồng mùa vụ.

Sáng chế cũng đề cập đến các đặc tính chức năng của gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lúa là cây trồng chủ yếu mà cung cấp lương thực cho con người sử dụng ở mức độ toàn cầu. Kích thước hệ gen của cây lúa là khoảng 430 Mb, kích thước này nhỏ hơn một cách tương đối so với kích thước hệ gen của các loại ngũ cốc khác mà có kích thước thay đổi nằm trong khoảng từ 430 Mb đến khoảng 17000 Mb, ví dụ, kích thước hệ gen của cây lúa mì để làm bánh mì là khoảng 16.900 Mb, cây ngô là khoảng 2.600 Mb, cây lúa miến là khoảng 735 Mb, điều này làm cho cây lúa trở thành mô hình cây trồng ngũ cốc lý tưởng.

Được quan sát thấy, các yếu tố môi trường bất lợi là do các yếu tố sinh học bất lợi, ví dụ, virus, vi khuẩn, nấm, côn trùng hoặc các loài giun tròn; hoặc do các yếu tố vô sinh, ví dụ quá nhiều nước, nghĩa là, úng lụt, và/hoặc điều kiện quá nhiều muối, nghĩa là, độ mặn cao hơn, và/hoặc bị thiếu nước nghiêm trọng, nghĩa là, hạn hán, và/hoặc nhiệt độ khắc nghiệt, nghĩa là, nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp. Tập hợp tất cả các yếu tố này đều ảnh hưởng đến sản lượng tiềm năng của cây trồng mùa vụ. Hơn nữa, các điều kiện khí hậu thay đổi và quá trình tăng nhiệt toàn cầu được xem như là những mối đe dọa tiềm ẩn đối với nguồn thực phẩm tự cung cấp. Do có hiểu biết rõ hơn đối với các tương tác thực vật-tác nhân gây bệnh, nên thực tế là các thực vật được biến đổi gen hiện nay có khả năng sống sót tốt hơn nếu bị côn trùng, yếu tố sinh học tấn công. Các ví dụ thông thường về các đa dạng như vậy là bông Bt và cà tím Bt.

Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có cây trồng mùa vụ mà có thể chống lại các yếu tố vô sinh bất lợi, mà chủ yếu gây ra bởi nhiều yếu tố vô sinh bất lợi trong tự nhiên.

Do đó, có nhu cầu khẩn cấp để biến đổi các cây trồng mùa vụ sao cho chúng có khả năng sống sót và duy trì được sản lượng cao trong các điều kiện vô sinh bất lợi khắc nghiệt của môi trường, và như vậy, tạo ra các thực vật chống chịu yếu tố bất lợi, nghĩa là, có nhu cầu khẩn cấp để cải biến sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, sao cho các cây trồng này có thể sống sót qua những trở ngại gây ra bởi các yếu tố bất lợi của môi trường.

Một trong các cách tiềm năng mà tạo ra khả năng chống chịu yếu tố bất lợi trong cây trồng có thể được cải thiện đó là bằng công nghệ di truyền, trong đó, một hoặc nhiều gen được thiết kế để tạo ra tính trạng mong muốn. Với các mục đích chủ ý này,

gần đây đã tạo ra được một số thực vật cải biến. Một ví dụ như vậy liên quan đến các gen mà có thể tổng hợp thể osmolytes (điều tiết áp suất thẩm thấu) để giữ được nước trong tế bào ở điều kiện thẩm thấu bất lợi. Các loại khác bao gồm sự biến đổi các gen mà có khả năng bơm chọn lọc các ion Natri độc tính vào không bào, và như vậy có khả năng giữ tế bào chất không bị độc.

Tuy nhiên, hiện vẫn chưa hiểu rõ cơ chế cũng như thiếu bộ máy cảm ứng liên quan đến các yếu tố thẩm thấu bất lợi mà có khả năng đạt đến mức thích hợp.

Trong các sinh vật bậc thấp, ví dụ nấm men, độ mẫn cảm với thẩm thấu được đã được hiểu rõ, và do đó, sự bồi hoàn chức năng của các thể đột biến mẫn cảm với thẩm thấu của nấm men có gen đích vào các cây trồng mùa vụ sẽ là một cách tiềm năng cho các gen mới có giá trị về mặt chức năng đối với các chức năng tương tự. Sự biến đổi di truyền trong các cây trồng mùa vụ liên quan đến bộ máy mẫn cảm với thẩm thấu của chúng sẽ là hết sức mong muốn, do nó sẽ dẫn đến sự chống chịu tốt hơn đối với các yếu tố thẩm thấu bất lợi.

Có nhiều nỗ lực nhằm tạo ra thực vật biến đổi gen, trong đó hiệu suất cây trồng được nâng cao dưới các yếu tố bất lợi cụ thể, ví dụ độ mặn hoặc hạn hán hoặc yếu tố vô sinh bất lợi bất kỳ khác. Cho đến thời điểm hiện nay, các thực vật biến đổi gen này sử dụng các gen mà được cảm ứng bởi từng yếu tố bất lợi cụ thể.

Tuy nhiên cho đến thời điểm hiện nay, vẫn chưa thu được thực vật biến đổi gen mà sử dụng gen được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và vì thế, các gen như vậy là hết sức mong muốn và có lợi thế, và do đó, hiện tại là có nhu cầu về gen mà có thể chống lại nhiều yếu tố bất lợi sao cho thực vật sử dụng gen như vậy có thể chống lại nhiều yếu tố bất lợi trong khi vẫn giữ được sản lượng tiềm năng của nó.

Sự cần thiết của sáng chế

Do đó, có nhu cầu cấp thiết để có gen mà có khả năng mẫn cảm với thẩm thấu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và có khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, cụ thể là trong các cây trồng biến đổi gen sao cho tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu được với nhiều hơn một điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường, và bằng cách đó, làm tăng giá trị kinh tế của chúng trong khi vẫn giữ được sản lượng, phương pháp phân lập, và danh

mục trình tự của các gen này, và phương pháp nhân dòng gen này, ít nhất, trong vector biểu hiện của nấm men và vector biểu hiện của thực vật, và các dòng được tạo ra bằng cách nhân dòng trong vector biểu hiện của nấm men và vector biểu hiện của thực vật. Cũng có nhu cầu cấp thiết để có phương pháp cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, và các cây trồng mùa vụ có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện. Ngoài ra, cũng có nhu cầu cấp thiết để có các đặc tính chức năng của gen như vậy.

Các tồn tại được giải quyết bởi sáng chế

Do đó, mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết các tồn tại về sự chống chịu kém đối với yếu tố bất lợi trong các cây trồng mùa vụ bằng cách đề xuất gen có khả năng miễn cảm với thẩm thấu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và có khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau này trong các cây trồng mùa vụ, cụ thể là trong các cây trồng biến đổi gen sao cho tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu được với nhiều điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường, và phương pháp phân lập gen này từ giống lúa indica IR64, và phương pháp cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong cây trồng mùa vụ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo đó, mục đích chính theo sáng chế là đề xuất gen kinaza histidin dạng lai mà được phân lập từ giống lúa indica IR64, và có khả năng miễn cảm với thẩm thấu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và do đó, có khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ sao cho tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu với nhiều điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường, và vì thế, làm tăng giá trị kinh tế của các cây trồng mùa vụ này trong khi vẫn giữ được sản lượng tiềm năng của nó.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân lập gen kinaza histidin dạng lai mà được phân lập từ giống lúa indica IR64.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất danh mục trình tự gen kinaza histidin dạng lai, mà được phân lập từ giống lúa indica IR64.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai mà được phân lập từ giống lúa indica IR64, ít nhất, trong vectơ biểu hiện của nấm men và vectơ biểu hiện của thực vật.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các dòng được tạo bởi quá trình nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai, được phân lập từ giống lúa indica IR64, trong vectơ biểu hiện của nấm men và vectơ biểu hiện của thực vật.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các đặc tính chức năng của gen kinaza histidin dạng lai mà được phân lập từ giống lúa indica IR64.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ bằng cách sử dụng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các cây trồng mùa vụ có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất ứng dụng gen kinaza histidin dạng lai, được phân lập từ giống lúa indica IR64, để cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ.

Các mục đích và các ưu điểm khác của sáng chế được hiểu rõ hơn khi tham khảo phần mô tả dưới đây và bản chất của sáng chế, kết hợp với các hình vẽ kèm theo, mà các hình này không nhằm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1A minh họa các trình tự môi được sử dụng để phân lập gen từ giống lúa indica IR64 theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 1B minh họa các điều kiện khác nhau của phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR) để phân lập gen từ giống lúa indica IR64 và quá trình nhân dòng của gen này theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 1C minh họa quá trình điện di sản phẩm phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) trên gel agarosa, thể hiện kích thước sản phẩm khuếch đại khoảng 2,6Kb, kích thước chính xác là khoảng 2598 bp của gen được phân lập từ giống lúa indica IR64, theo phương án được đặc biệt ưu tiên của sáng chế.

Fig. 2A minh họa trình tự gen hoàn chỉnh của khung đọc mở (open reading frame: ORF) của *OsHk3b*, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 2B minh họa trình tự axit amin hoàn chỉnh được suy luận của protein được mã hóa bởi ORF của *OsHk3b*, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 3A minh họa sự khẳng định quá trình nhân dòng gen theo sáng chế trong vectơ pYES2, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 3B minh họa sự khẳng định quá trình nhân dòng gen theo sáng chế trong vectơ pCAMBIA1304, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 4 minh họa sự bù chức năng trong thể đột biến HS13 miễn cảm với thẩm thấu phụ thuộc nhiệt độ SLN1 trong nấm men bởi ORF của *OsHk3b* của cây lúa, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 5 minh họa biểu đồ thể hiện sự cảm ứng của *OsHk3b* trong cây lúa bởi các yếu tố vô sinh bất lợi khác nhau, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 6 minh họa sự biến nạp và tái sinh của *Oryza sativa* cv IR64 - minh họa các hạt lúa IR-64; bước - (a); tạo thành thể sần của lúa trên các môi trường tạo thể sần; bước - (b); thể sần của lúa sau nuôi cấy được giữ trên các môi trường tạo thể sần trong khoảng 5-7 ngày; bước - (c); đồng chuyển nhiễm thể sần của lúa bằng chủng *Agrobacterium* LBA4404 chứa cấu trúc gen *OsHk3b*; bước - (d); đồng nuôi thể sần của cây lúa được đồng chuyển nhiễm; bước - (e); rửa *Agrobacterium* phát triển quá mức bằng kháng sinh xefotaxim; bước - (f); chuyển thể sần của lúa đã được rửa vào đĩa chọn lọc; bước - (g); thể sần của lúa biến nạp được giữ trên môi trường tái sinh; bước - (h); lúa non tái sinh khi được chuyển vào môi trường tái sinh mới; bước - (i); lúa được tái sinh hoàn toàn khi được chuyển vào các ống nuôi cấy để phát triển thêm; bước - (j); cây lúa biến đổi gen từ bước - (j) được chuyển ra bình đất nung và được giữ trong nhà kính; bước - (k) theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 7A minh họa khẳng định sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau của lá cây được phát triển trong Fig. 6 bằng thử nghiệm đĩa lá, thể hiện tốc độ bị làm trắng các mẫu lá khác nhau trong các điều kiện đối chứng và độ mặn bất lợi, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 7B minh họa hàm lượng chất diệp lục tổng số của các lá thực vật được phát triển trong Fig. 6, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 8 minh họa khẳng định sự cài nhập thành công gen *OsHk3b* theo sáng chế vào hệ gen các cây lúa IR64 biến đổi gen bằng cách sử dụng plasmit - pCAMBIA1304, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 9 minh họa khẳng định sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau của các cây T1, về mặt nảy mầm của hạt trong các điều kiện độ mặn, được phát triển từ các hạt của các cây được phát triển trong Fig. 6, theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế.

Fig. 10 minh họa so sánh, khẳng định sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các thực vật T1 được phát triển 7 ngày trong các điều kiện bình thường, và sau đó, được phát triển tiếp 10 ngày trong các điều kiện mặn, bằng cách đo các hàm lượng chất diệp lục của cây.

Các ghi chú chi tiết của các Fig. được mô tả ở cuối bản mô tả này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hiện tại được hiểu rằng tình trạng kỹ thuật không bộc lộ hoặc hướng dẫn là gen kinaza histidin dạng lai, mà có khả năng miễn cảm với thẩm thấu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi và khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, cụ thể là trong các cây trồng biến đổi gen, có thể được phân lập từ giống lúa indica IR64.

Hơn nữa, tình trạng kỹ thuật không bộc lộ hoặc hướng dẫn là gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64 có thể được nhân dòng, ít nhất, trong vector biểu hiện của nấm men và vector biểu hiện của thực vật.

Hơn nữa, tình trạng kỹ thuật không bộc lộ hoặc hướng dẫn là cây trồng mùa vụ có thể được cải thiện sự chống chịu của chúng đối với nhiều yếu tố bất lợi bằng cách sử dụng gen được phân lập này sao cho tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu với nhiều điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường để giải quyết các khó khăn về sự chống chịu kém đối với yếu tố bất lợi trong cây trồng mùa vụ.

Với mục đích phân lập gen kinaza histidin dạng lai từ giống lúa indica IR64, các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng nếu cADN, được phân lập từ IR64 trồng từ hạt, được xử lý bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) với mỗi xuôi *OsHk3bF* và mỗi ngược *OsHk3bR*, trong đó, bước gắn mỗi được thực hiện tại khoảng 55⁰C, sau đó gen kinaza histidin dạng lai được phân lập, và gen được phân lập này, bất ngờ phát hiện ra rằng chúng có khả năng miễn cảm với thâm thấu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và có khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, cụ thể là trong các cây trồng biến đổi gen.

Nhằm mục đích nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64, ít nhất, trong vectơ biểu hiện của nấm men và vectơ biểu hiện của thực vật, các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng, gen phân lập dựa trên quá trình khuếch đại bằng cách xử lý với mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR* sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), gen theo sáng chế được nhân dòng trong vectơ biểu hiện của nấm men và cũng được nhân dòng trong vectơ biểu hiện của thực vật.

Nhằm mục đích cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng, khi thể sản của cây lúa phát triển từ các hạt IR64 được đồng chuyển nhiễm với môi trường chứa gen được nhân dòng, IR64 này là khả biến và phát triển thành cây lúa IR64 biến đổi gen hoàn chỉnh, có gen theo sáng chế biểu hiện vượt trội, và các cây lúa biến đổi gen phát triển này cho thấy khả năng chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện một cách bất ngờ, có khả năng chống lại nhiều hơn một các yếu tố môi trường bất lợi, nghĩa là, bằng cách này, các thực vật phát triển như vậy được phát hiện là có khả năng sống sót tốt hơn trong các điều kiện có yếu tố vô sinh bất lợi.

Đã phát hiện ra rằng các hạt của các cây trồng biến đổi gen mà được phát triển bằng cách sử dụng các dòng gen theo sáng chế cũng có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện trong quá trình nảy mầm của hạt, và bất ngờ là, cả rễ và thân, không có biểu hiện giảm sự phát triển, và các thực vật được phát triển từ đó cũng cho thấy là có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện khi so với sự nảy mầm các hạt của các cây trồng mùa vụ bình thường và các thực vật được phát triển từ cây trồng mùa vụ này. Do đó, các khó khăn về sự chống chịu kém đối với yếu tố bất lợi trong các cây trồng mùa vụ được giải quyết theo sáng chế.

Theo đó, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập gen kinaza histidin dạng lai từ giống lúa indica IR64, phương pháp này bao gồm bước xử lý cADN được phân lập từ IR64 trồng từ hạt với mỗi xuôi *OsHk3bF* và mỗi ngược *OsHk3bR* bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), trong đó, bước gắn mỗi được thực hiện tại khoảng 55⁰C, và trong đó, gen kinaza histidin dạng lai *OsHk3b* được phân lập từ plasmit pTOPO-*OsHk3b*.

Theo sáng chế, mỗi xuôi *OsHk3bF* có trình tự 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' và mỗi ngược *OsHk3bR* có trình tự 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' (Fig. 1A).

Theo sáng chế, các đoạn mỗi này được tổng hợp bởi:

a) bắt cặp trình tự axit amin (protein) của SLN1 (gen cảm biến thẩm thấu) của nấm men với các trình tự axit amin (protein) của 14 thành viên của họ kinaza histidin (HK) trong lúa (*Oryza sativa japonica*), trong đó một thành viên của họ HK - *OsHk3b* trong lúa (*Oryza sativa japonica*) trong số 14 thành viên này của họ được thấy là gần nhất với SLN1 (gen cảm biến thẩm thấu) trong nấm men;

b) dựa trên các trình tự axit amin của *OsHk3b* từ lúa (*Oryza sativa japonica*), trình tự nucleotit tương ứng của nó được sử dụng;

c) phân tích ORF của nó bằng cách sử dụng phần mềm có sẵn;

d) thiết kế mỗi xuôi *OsHk3bF*, có trình tự 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' và mỗi ngược *OsHk3bR*, có trình tự 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' từ ORF của *OsHk3b* bằng cách sử dụng phần mềm thiết kế mỗi có sẵn;

e) nhận biết các trình tự nucleotit của mỗi xuôi và mỗi ngược; và

f) tạo ra mỗi xuôi *OsHk3bF* có trình tự 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' và mỗi ngược *OsHk3bR* có trình tự 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3'.

Theo một trong số các phương án ưu tiên theo sáng chế, phân tích ORF được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm trực tuyến (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/).

Theo một trong số các phương án ưu tiên theo sáng chế, thiết kế mỗi xuôi *OsHk3bF*, có trình tự 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3,' và mỗi ngược *OsHk3bR*,

có trình tự 5'CTATTCAACTTGGTCAT GATTTTG3' từ ORF của *OsHk3b* được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm thiết kế môi trực tuyến (www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/).

Theo sáng chế, cADN được phân lập từ các cây lúa IR64 trồng từ hạt, cụ thể là từ các cây cv IR64 trồng từ hạt bao gồm các bước:

- a) phân lập ARN tổng số từ mô lá chịu độ mặn bất lợi của IR64 trồng từ hạt;
- b) phân lập mARN từ ARN tổng số bằng cách sử dụng các hạt streptavidin thuận từ và môi d(T)20 gắn được đánh dấu bằng biotin;
- c) tổng hợp mạch cADN thứ nhất từ mARN bằng cách sử dụng kit thông dụng có sẵn để tổng hợp mạch cADN thứ nhất.

Theo sáng chế, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) bao gồm các bước:

- i) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng của cADN, và môi xuôi *OsHk3bF*, có trình tự 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' và môi ngược *OsHk3bR*, có trình tự 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3';
- ii) biến tính hỗn hợp phản ứng ban đầu từ bước i), tốt hơn là tại khoảng 94°C trong khoảng 5 phút;
- iii) biến tính hỗn hợp phản ứng từ bước ii), tốt hơn là cho khoảng 34 chu kỳ tại khoảng 94°C trong khoảng 1 phút;
- iv) gắn môi hỗn hợp phản ứng từ bước iii), tốt hơn là tại khoảng 55°C trong khoảng 1 phút;
- v) tổng hợp hỗn hợp phản ứng từ bước iv), tốt hơn là tại khoảng 72°C trong khoảng 3 phút; và
- vi) tổng hợp lần cuối hỗn hợp phản ứng từ bước v), tốt hơn là tại khoảng 72°C trong khoảng 7 phút.

Theo sáng chế, phương pháp phân lập gen kinaza histidin dạng lai từ giống lúa indica IR64, còn bao gồm các bước sau:

- 1) chuẩn bị plasmit tái tổ hợp pTOPO-*OsHk3b* bằng cách nhân dòng đoạn gen được khuếch đại trong vector TOPO-TA2.1;

2) phân lập gen *OsHk3b* từ plasmit tái tổ hợp pTOPO-*OsHk3b* bằng cách sử dụng môi xuôi và môi ngược chuẩn của M13;

trong đó, sự phân lập gen - *OsHk3b* được khẳng định (được nhận biết) bằng kích thước của ADN khoảng 2,6Kb, chính xác hơn là khoảng 2598 bp.

Theo sáng chế, sau khi thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) với mỗi lựa chọn, nhiều bản sao của ADN đích được tạo ra mà không nhìn thấy được trong dung dịch, nhưng khi được nối vào vectơ nhân dòng TOPO-TA làm bền ADN đích, các khuẩn lạc được biến nạp có thể nhìn thấy được, tuy nhiên sản phẩm khuếch đại này có thể được quan sát qua bước điện di trên agarosa kèm theo quá trình nhuộm bởi etidium bromit. TOPO-TA chỉ được sử dụng để tạo độ bền sản phẩm khuếch đại mà cũng dễ dàng để xác định trình tự. Gen được tạo ra nghĩa là quá trình phân lập được giả định. Sau khi tạo ra như trong Fig. 1C, sự phân lập được khẳng định bởi quá trình xác định trình tự, bằng trên the gel agarosa khẳng định là gen đã được phân lập.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64, và gen được phân lập cho thấy là có khả năng hoạt động như gen cảm biến thẩm thấu, và có khả năng miễn cảm với thẩm thấu và được cảm ứng bởi nhiều yếu tố bất lợi, và khả năng cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, cụ thể là trong các cây trồng biến đổi gen sao cho tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu với nhiều điều kiện vô sinh bất lợi của môi trường, và vì thế, làm tăng giá trị kinh tế của chúng trong khi giữ được sản lượng tiềm năng của nó.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến danh mục trình tự gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64, trong đó, gen này được xác định trình tự sau khi tạo thành plasmit tái tổ hợp pTOPO-*OsHk3b*, và trong đó, trình tự gen hoàn chỉnh của khung đọc mở (ORF) của gen *OsHk3b* là 2598 bp và trình tự như được đưa ra trong Fig. 2A kèm theo là tham chiếu đối với gen được nêu ra ở đây, và trong đó gen *OsHk3b* theo sáng chế được nộp lên National Center for Biotechnology Information (National Center for Biological Resources (NCBI) tại địa chỉ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/198387187>) với số truy cập Genbank là Bankit

1121378 FJ004641 ngày 7/08/2008. Bản tài liệu nộp của National Center for Biotechnology Information (NCBI) được nộp kèm theo.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến gen kinaza histidin dạng lai, trình tự gen hoàn chỉnh của khung đọc mở (ORF) của *OsHk3b* là 2598 bp và như được đưa ra trong Fig. 2A.

Theo một phương án theo sáng chế, gen kinaza histidin dạng lai, *OsHk3b* có thể được nhận biết bằng số truy cập Genbank là Bankit 1121378 FJ004641 của National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64 trong vector biểu hiện của nấm men, cụ thể là pYES2, phương pháp này bao gồm các bước:

a) khuếch đại gen *OsHk3b* từ plasmit pTOPO-*OsHk3b* bằng cách xử lý plasmit pTOPO-*OsHk3b* với mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR* bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR);

trong đó, đoạn gen *OsHk3b* được khuếch đại, chứa khung đọc mở hoàn chỉnh (ORF) của gen này cùng với vị trí bổ sung *SpeI* - *OsHk3b*, trở nên được nhân dòng tại vị trí *XbaI* trong pYES2.

Theo sáng chế, các môi được sử dụng cho quá trình nhân dòng gen được phân lập tương tự các môi được sử dụng để phân lập gen này, nhưng các môi cho quá trình nhân dòng gen được phân lập chứa vị trí bổ sung *SpeI* để thuận lợi cho quá trình nhân dòng gen *OsHk3b* trong pYES2.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, sau phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) của *OsHk3b* với mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR*, pYES2 được bổ sung.

Theo sáng chế, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để khuếch đại gen - *OsHk3b* từ plasmit pTOPO-*OsHk3b* bao gồm các bước:

i) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng của plasmit pTOPO-*OsHk3b*, và mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR*;

ii) biến tính ban đầu của hỗn hợp phản ứng bước i), tốt hơn là tại khoảng 94°C trong khoảng 5 phút;

iii) biến tính hỗn hợp phản ứng từ bước ii), tốt hơn là trong khoảng 34 chu kỳ ở khoảng 94°C trong khoảng 1 phút;

iv) gắn môi hỗn hợp phản ứng từ bước iii) tốt hơn là ở khoảng 55°C trong khoảng 1 phút;

v) tổng hợp hỗn hợp phản ứng từ bước iv) tốt hơn là ở khoảng 72°C trong khoảng 3 phút; và

vi) tổng hợp lần cuối hỗn hợp phản ứng từ bước v), tốt hơn là, ở khoảng 72°C trong khoảng 7 phút.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, sau khi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) của *OsHk3b* với môi xuôi *OsHk3bSpeIF* và môi ngược *OsHk3bSpeIR*, pYES2 được bổ sung.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến dòng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64 trong vector biểu hiện của nấm men, cụ thể là - pYES2, mà được nhận biết như pYES2-*OsHk3b*.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR6 trong vector biểu hiện của thực vật, tốt hơn là vector biểu hiện trong lúa, cụ thể là pCAMBIA1304, phương pháp này bao gồm các bước:

a) khuếch đại gen *OsHk3b* từ plasmit pTOPO-*OsHk3b* bằng cách xử lý plasmit pTOPO-*OsHk3b* với môi xuôi *OsHk3bSpeIF* và môi ngược *OsHk3bSpeIR* sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR);

trong đó, đoạn gen *OsHk3b* được khuếch đại chứa khung đọc mở hoàn chỉnh (ORF) của gen này cùng với vị trí bổ sung *SpeI* - *OsHk3* sẽ được nhân dòng tại vị trí *SpeI* của pCAMBIA1304.

Theo sáng chế, các đoạn môi được sử dụng cho quá trình nhân dòng gen được phân lập là tương tự các môi được sử dụng để phân lập gen này, nhưng các môi để

nhân dòng gen được phân lập này chứa vị trí bổ sung *SpeI* để thuận lợi cho quá trình nhân dòng gen *OsHk3* trong pCAMBIA1304.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, sau khi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) của *OsHk3b* với mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR*, pCAMBIA1304 được bổ sung.

Theo sáng chế, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để khuếch đại gen - *OsHk3b* từ plasmit pTOPO-*OsHk3b* bao gồm các bước:

i) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng plasmit pTOPO-*OsHk3b*, và mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR*;

ii) biến tính hỗn hợp phản ứng ban đầu từ bước i), tốt hơn là tại khoảng 94°C trong khoảng 5 phút;

iii) biến tính hỗn hợp phản ứng từ bước ii), tốt hơn là trong khoảng 34 chu kỳ tại khoảng 94°C trong khoảng 1 phút;

iv) gắn mỗi hỗn hợp phản ứng từ bước iii), tốt hơn là tại khoảng 55°C trong khoảng 1 phút;

v) tổng hợp hỗn hợp phản ứng từ bước iv), tốt hơn là tại khoảng 72°C trong khoảng 3 phút; và

vi) tổng hợp cuối cùng hỗn hợp phản ứng từ bước v), tốt hơn là tại khoảng 72°C trong khoảng 7 phút.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, sau khi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) của *OsHk3b* với mỗi xuôi *OsHk3bSpeIF* và mỗi ngược *OsHk3bSpeIR*, pCAMBIA1304 được bổ sung.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến dòng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64 trong vector biểu hiện trong lúa, cụ thể là pCAMBIA1304, mà được nhận biết như pCAMBIA1304-*OsHk3b*.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, phương pháp này bao gồm quá trình đồng chuyển nhiễm thể sắn của cây lúa được phát triển từ hạt IR64 trong môi

trường chứa gen được nhân dòng và cho phép thể sản của cây lúa được đồng chuyển nhiễm này tái sinh hoàn chỉnh thành cây lúa IR64 biến đổi gen, trong đó, môi trường này có chủng *Agrobacterium* LBA4404, và gen được nhân dòng là pCAMBIA1304-*OsHk3b*.

Theo sáng chế, phương pháp cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ, phương pháp này bao gồm các bước:

a) đồng chuyển nhiễm thể sản của cây lúa được phát triển từ các hạt IR64 với môi trường chứa gen được nhân dòng;

b) đồng nuôi cấy thể sản của cây lúa bị đồng chuyển nhiễm này từ bước a);

c) rửa môi trường phát triển quá mức của thể sản của cây lúa được đồng nuôi cấy từ bước b) bằng kháng sinh;

d) chuyển thể sản của lúa đã được rửa từ bước c) trên đĩa chọn lọc cho sinh trưởng của thể sản của cây lúa được biến nạp;

e) xử lý thể sản của cây lúa được biến nạp từ bước d) với môi trường tái sinh;

f) lặp lại bước xử lý thể sản của cây lúa được biến nạp từ bước e) với môi trường tái sinh mới cho đến khi tạo ra cây lúa được tái sinh hoàn chỉnh;

g) làm tăng tính chịu đựng cho cây lúa được tái sinh hoàn toàn từ bước f) trong ống nuôi cấy;

h) chuyển cây lúa được làm tăng tính chịu đựng từ bước g) ra bình đất nung để phát triển thành cây lúa IR64 biến đổi gen hoàn chỉnh;

trong đó, môi trường này chứa chủng *Agrobacterium* LBA4404, và gen được nhân dòng là pCAMBIA1304-*OsHk3b*.

Theo một trong số các phương án ưu tiên theo sáng chế, bước b) đồng nuôi cấy được thực hiện bằng cách giữ thể sản của cây lúa được đồng chuyển nhiễm từ bước a) trong bóng tối trong khoảng 48 giờ.

Theo một trong số các phương án ưu tiên theo sáng chế, ống nuôi cấy trong bước g) chứa các cây lúa tái sinh trong các môi trường tái sinh.

Theo sáng chế, kháng sinh là xefotaxim, và các môi trường tái sinh chứa các môi trường Moorashige và Skoog có trên thị trường (Sigma, India).

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các cây trồng mùa vụ có sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau được cải thiện như được tạo ra bằng cách sử dụng gen được phân lập từ giống lúa indica IR64 theo sáng chế, trong đó, cây trồng biến đổi gen này được cho thấy có sự biểu hiện vượt trội của gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64, và cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau chịu được nhiều hơn một yếu tố môi trường bất lợi, nghĩa là bằng cách này, cây trồng biến đổi gen được tạo ra theo sáng chế được phát hiện là có khả năng sống sót tốt hơn trong các điều kiện yếu tố vô sinh bất lợi, và do đó, giải quyết được vấn đề về sự chống chịu kém đối với yếu tố bất lợi.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến thế hệ thứ hai của cây trồng được tạo ra từ hạt của cây trồng biến đổi gen thế hệ thứ nhất, mà được phát triển bằng cách sử dụng dòng gen theo sáng chế, trong đó, thế hệ các cây trồng biến đổi gen phát triển tiếp sau (thế hệ thứ hai) cũng thể hiện khả năng cải thiện chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau, và thậm chí trong thời kỳ nảy mầm hạt của các cây trồng biến đổi gen thế hệ thứ nhất, một cách bất ngờ, rễ và thân, được phát hiện thấy sự phát triển tốt hơn, ít nhất, không thấy sự phát triển bị giảm. Ngược lại, thực vật được phát triển từ các cây trồng từ hạt không được chuyển nhiễm với các dòng gen theo sáng chế được phát hiện có sự chống chịu kém đối với các yếu tố môi trường bất lợi, và hơn nữa, trong quá trình nảy mầm các hạt từ các cây bình thường (đối chứng) này, rễ và thân được thấy là phát triển chậm.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng gen kinaza histidin dạng lai, được phân lập từ giống lúa indica IR64, để cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ.

Sau đây, sáng chế được mô tả cùng với sự tham khảo các hình vẽ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế, phương pháp theo sáng chế bao gồm các bước sau:

A) Phân lập gen kinaza histidin dạng lai từ giống lúa indica IR64

Theo phương án được ưu tiên nhất của sáng chế, gen có chiều dài đầy đủ, nghĩa là, chuỗi ADN mã hóa cho protein của gen *OsHk3b* được phân lập từ giống lúa cv IR64 chủ yếu bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) mà về cơ bản được thực hiện bằng cách sử dụng mỗi xuôi *OsHk3bF*, có trình tự 5'ATGACGTTTCGCGAGGTACGC3' và mỗi ngược *OsHk3bR*, có trình tự 5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3' (Fig. 1A), các mồi này được chọn lọc một cách đặc hiệu. Bất ngờ là, nếu cố gắng tiến hành phân lập gen này từ giống lúa IR64 bằng cách sử dụng mồi bất kỳ khác, thì sẽ không phân lập được gen này.

Theo sáng chế, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được thực hiện trong điều kiện như được mô tả trong Fig. 1B mà cũng được chọn lọc một cách đặc hiệu. Bất ngờ là, nếu cố gắng tiến hành phản ứng PCR này tại trong điều kiện khác với các điều kiện được minh họa trong Fig. 1B kèm theo, thì không phân lập được gen mong muốn.

Theo sáng chế, các điều kiện PCR (Fig. 1B) bao gồm: biến tính ban đầu được thực hiện tại khoảng 94°C trong khoảng 5 phút, theo sau khoảng 34 chu kỳ biến tính được thực hiện tại khoảng 94°C trong khoảng 1 phút, gắn mồi tại khoảng 55°C trong khoảng 1 phút, tổng hợp tại khoảng 72°C trong khoảng 3 phút và tổng hợp cuối cùng tại khoảng 72°C trong khoảng 7 phút bằng cách sử dụng các mồi *OsHk3bF* và *OsHk3bR* (Fig. 1B).

Theo sáng chế, ARN tổng số được phân lập từ mô lá chịu độ mặn bất lợi của IR64 trồng từ hạt. Tiếp đó là phân lập mARN từ ARN tổng số bằng cách sử dụng các hạt streptavidin thuận từ và mồi d(T)20 ngắn được đánh dấu biotin. Mạch cADN thứ nhất được tổng hợp từ mARN bằng cách sử dụng kit tổng hợp mạch cADN thứ nhất. Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) được thực hiện như được mô tả trên đây. Đoạn khuếch đại được nhân dòng trong vector TOPO-TA2.1 để thu được plasmid tái tổ hợp pTOPO-*OsHk3b*. Fig. 1C kèm theo minh họa sản phẩm PCR khuếch đại từ plasmid pTOPO-*OsHk3b* bằng cách sử dụng các mồi xuôi và mồi ngược chuẩn của M13. Kích thước ADN của *OsHk3b* được thấy trên the gel (Fig. 1C) là khoảng 2,6Kb, chính xác hơn là khoảng 2598 bp, điều này khẳng định là gen *OsHk3b* đã được phân lập.

B) Xác định trình tự gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64

Theo sáng chế, theo một phương án, gen được phân lập từ giống lúa indica IR64 được xác định trình tự sau khi tạo ra plasmit tái tổ hợp pTOPO-*OsHk3b*. Trình tự ADN như thu được sau khi xác định trình tự, được minh họa trong Fig. 2A kèm theo, minh họa trình tự gen hoàn chỉnh của ORF của *OsHk3b* mà gen này là 2598 bp và được nộp cho National Center for Biotechnology Information (NCBI) với số truy cập Genbank là Bankit 1121378 FJ004641 ngày 7/08/2008. Bản sao tài liệu này từ National Center for Biotechnology Information (NCBI) được nộp kèm theo.

Theo sáng chế, trình tự ADN, như thu được, được phân tích bằng cách sử dụng công cụ so sánh BLAST, bắt ngờ là trình tự này tương đồng với gen đã biết được phân loại như gen kinaza histidin dạng lai của các sinh vật khác mà trong cây lúa IR6 có các thay đổi không đáng kể. Hơn nữa, cADN phân lập được khẳng định có chiều dài ORF khoảng 2598 bp mà có khả năng mã hóa cho polypeptit có khoảng 865 gốc axit amin (Fig. 2B). Khối lượng phân tử dự đoán của polypeptit dự kiến khoảng 95,90 kDa. Protein dự kiến này chứa cả vùng truyền và vùng nhận tín hiệu. Đó là các đặc điểm đặc trưng cho kinaza histidin dạng lai. Nó cũng thể hiện gốc histidin bảo thủ tại vị trí 291 như được minh họa trong Fig. 2B kèm theo trong phần được gạch chân từ dòng 6 từ phía trên trong vùng truyền tín hiệu và gốc aspartat bảo thủ tại vị trí 772 như được minh họa trong Fig. 2B kèm theo từ vị trí gạch chân trong dòng thứ hai từ phía dưới trong vùng nhận tín hiệu. Fig. 2B kèm theo minh họa trình tự axit amin hoàn chỉnh dự kiến đối với protein được mã hóa bởi ORF của *OsHk3b*, protein này khoảng 95,9 kDa, trong đó, vùng truyền tín hiệu có gốc Histidin bảo thủ tại vị trí 291 (H, được gạch chân). Vùng nhận tín hiệu có gốc Aspartat bảo thủ tại vị trí 771 (D, được gạch chân).

Theo đó, sáng chế đề xuất gen của giống lúa indica cv IR64 mà có tất cả đặc điểm đặc trưng cho gen kinaza histidin dạng lai. Trình tự ADN của gen *OsHk3b* phân lập này cũng nộp lưu tại được nộp cho National Center for Biotechnology Information (NCBI) với số truy cập Bankit 1121378 ngày 7/8/2008. Bản sao tài liệu này từ National Center for Biotechnology Information (NCBI) được nộp kèm theo.

C) Quá trình nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa indica IR64

C1) Quá trình nhân dòng trong vector biểu hiện của nấm men pYES2

Theo sáng chế, gen *OsHk3b* theo sáng chế được nhân dòng trong vector biểu hiện của nấm men, cụ thể là pYES2, bằng quá trình khuếch đại gen *OsHk3b* trong pTOPO-*OsHk3b* sử dụng các môi *OsHk3bSpeIF* và *OsHk3bSpeIR* như được minh họa trong Fig. 1A kèm theo sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) trong các điều kiện như được minh họa trong Fig. 1B kèm theo, trong đó đoạn được khuếch đại chứa khung đọc mở hoàn chỉnh (ORF) của gen *OsHk3b* được nhân dòng tại vị trí *XbaI* của pYES2 và quá trình nhân dòng theo đúng khung đọc được khẳng định bằng cách cắt giới hạn bằng cách sử dụng *SphI* (Fig. 3A), trong đó cắt giới hạn plasmit pYES2-*OsHk3b* với *SphI* để khẳng định chiều ORF của *OsHk3b*; M: thang chuẩn ADN 1kb; 1, 2, 3, 4 và 5 là plasmit pYES2-*OsHk3b*; 6: pYES2 và 7: plasmit pYES2-*OsHk3b* không bị cắt, và giản đồ mô tả pYES2-*OsHk3b* được thể hiện phía trên hình vẽ.

Theo đó, sáng chế đề xuất gen *OsHk3b* mà có khả năng được nhân dòng trong vector biểu hiện của nấm men pYES2-*OsHk3b* và tạo ra dòng gen *OsHk3b* trong vector biểu hiện của nấm men pYES2-*OsHk3b*.

C2. Quá trình nhân dòng trong vector biểu hiện của thực vật - pCAMBIA1304

Theo sáng chế, gen *OsHk3b* theo sáng chế được nhân dòng trong vector biểu hiện của thực vật, cụ thể là pCAMBIA1304, bằng quá trình khuếch đại gen *OsHk3b* trong pTOPO-*OsHk3b* bằng cách sử dụng các môi *OsHk3bSpeIF* và *OsHk3bSpeIR* như được minh họa trong Fig. 1A kèm theo bằng cách sử dụng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) trong các điều kiện như được minh họa trong Fig. 1B kèm theo, trong đó đoạn khuếch đại chứa khung đọc mở hoàn chỉnh của gen *OsHk3b* là được nhân dòng trong vị trí *SpeI* của pCAMBIA1304 và nhân dòng theo đúng khung đọc được khẳng định bằng cách cắt giới hạn bằng cách sử dụng *SphI* (Fig. 3B), trong đó cắt giới hạn plasmit pCAMBIA1304-*OsHk3b* với *SphI* để khẳng định chiều ORF của *OsHk3b*; M: thang chuẩn ADN 1kb; 1, 2, 3 và 4: plasmit pCAMBIA1304-*OsHk3b*; 5: pCAMBIA1304 và 6: plasmit pCAMBIA1304-*OsHk3b* không bị cắt. Giản đồ mô tả pCAMBIA1304-*OsHk3b* được thể hiện phía trên hình vẽ.

Theo đó, sáng chế đề xuất gen *OsHk3b* mà có khả năng được nhân dòng trong vector biểu hiện của thực vật pCAMBIA1304-*OsHk3b* và tạo ra dòng gen *OsHk3b* trong vector biểu hiện của thực vật pCAMBIA1304-*OsHk3b*.

D) Đặc điểm chức năng (các ưu thế) của gen kinaza histidin dạng lai được phân lập từ giống lúa IR64

D1) Để xác minh là gen được đề xuất, *OsHk3b* có khả năng thực hiện chức năng như gen cảm biến thẩm thấu, nghĩa là ưu thế của nó trong quá trình cứu đột biến mẫn cảm với thẩm thấu trong nấm men, chủng nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) HS13 có đột biến gen *SLN1* mẫn cảm với nhiệt độ được sử dụng cho các thí nghiệm bổ sung (*sln-Ts*), theo phương án ưu tiên theo sáng chế. Được quan sát thấy rằng, thể đột biến HS13 phát triển tốt tại 28°C (Fig. 4A) nhưng không có khả năng phát triển tại 37°C (Fig. 4B) trên các môi trường YPD (các môi trường nấm men, pepton và dextroza) cũng như trên YPD chứa muối (NaCl 200mM). Theo sáng chế, thể đột biến HS13 được biến nạp với (i) pYES2-*OsHk3b*, (ii) vector pYES2 (vector không chứa *OsHk3b*) và (iii) gen chức năng *sln1* (của nấm men) để tạo ra chủng HS13 được biến đổi mà được thử nghiệm thêm. Hơn nữa, theo sáng chế, HS13 mang pYES2 (vector không chứa *OsHk3b*) hoạt động như đối chứng âm (VC) trong khi HS13 mang gen chức năng *sln1* hoạt động như đối chứng dương (*SLN1*). Khi tất cả các chủng này được cấy lên môi trường YPD và được ủ tại 28°C hoặc tại 37°C, bất ngờ là, sau khoảng 72 giờ ủ, HS13 được biến nạp với pYES2-*OsHk3b* và HS13 mang gen chức năng *sln1* là có thể phát triển thậm chí tại 37°C (Fig. 4B), trong khi nếu chỉ có HS13 hoặc HS13 mang pYES2 (VC) thì lại không thể phát triển tại 37°C, bằng cách đó khẳng định là khi bổ sung trong thể đột biến *sln1* với *OsHk3b* là có thể thu được, biểu thị ưu thế của gen *OsHk3b* trong quá trình cứu đột biến mẫn cảm với thẩm thấu trong nấm men.

Sau khi xác minh ưu thế của gen *OsHk3b* như gen cảm biến thẩm thấu mà có thể được sử dụng để cải thiện sự chống chịu đối với độ mặn bất lợi, thì cố gắng được thực hiện để tìm ra phương thức hoạt động của gen này bằng cách kiểm tra vai trò gốc Histidin và/hoặc Aspartat bảo thủ trong gen *OsHk3b*, các chất gây đột biến điểm định hướng của gen *OsHk3b* được thực hiện để gây đột biến gốc Histidin bảo thủ trong vùng truyền tín hiệu thành Valin (HK3H*, HS13 mang histidin bị đột biến *OSHK3H291V*) và gốc Aspartat bảo thủ thành Glutamat (HK3D*, HS13 mang aspartat bị đột biến

OSHK3D772E) trong protein *OsHk3b* được biểu hiện. (Các chất gây đột biến điểm định hướng pYES2-*OsHk3b* được thực hiện để gây đột biến gốc Histidin bảo thủ trong vùng truyền tín hiệu thành Valin bằng cách sử dụng mỗi xuôi, *OsHk3bHisMUTF* GGCTACTGTTTCAGTTGAGATCAGAACTC và mỗi ngược, *OsHk3bHisMUTR* AGTTCTGATCTCAACTGAAACAGTAGCC; trong khi gốc Aspartat bảo thủ thành Glutamat bằng cách sử dụng mỗi xuôi, *OsHk3bAspMUTF* GATGCTTGTTTCATGCTCATAACAGATGCCAG và mỗi ngược, *OsHk3bAspMUTR* -CTGGCATCTGTATGAGCATGAAACAAGCATC bằng cách sử dụng kit gây đột biến điểm định hướng thay đổi nhanh).

Phân tích trên đây khẳng định là đột biến trong nấm men HS13, được biến nạp với các gốc bảo thủ bị đột biến này của *OsHk3b* không bổ sung cho alen đột biến *sln1-Ts* chứa *HS13* của vật chủ tại 37°C (Fig. 4B), điều đó khẳng định *OsHk3b* là kinaza histidin dạng lai và Histidin và Aspartat bảo thủ có liên quan đến quá trình phosphoryl hóa trong sự phát triển của *HS13* tại 37°C. Hơn nữa, nấm men được biến nạp (*OsHk3b*) cho thấy là có khả năng chống chịu độ mặn bất lợi lên tới NaCl 200mM (YPD chứa NaCl 200mM), trong khi vector được biến nạp (VC) hoặc các tế bào HS13 không được biến nạp thì không thể sống sót tại 37°C (Fig. 4D). Phân tích này xác minh một cách rõ ràng là gen *OsHk3b*, mã hóa cho protein, có khả năng hoạt động như gen cảm biến thẩm thấu và có thể được sử dụng để cải thiện sự chống chịu đối với độ mặn bất lợi.

D2) Để xác minh là gen xuất hiện bởi *OsHk3b* được cảm ứng bởi các yếu tố vô sinh bất lợi khác nhau, phân tích PCR theo thời gian thực (qRT-PCR) được thực hiện để định lượng sự biểu hiện mRNA của gen này. Phân tích này được thực hiện bằng cách sử dụng các mẫu cADN khác nhau, được tạo ra từ mRNA của cây IR64 trồng từ hạt được tiếp xúc với các yếu tố vô sinh bất lợi khác nhau, nghĩa là, độ mặn (S), hạn hán (D), ABA (axit abscisic), nhiệt độ nóng (42°C) và nhiệt độ lạnh (4°C) trong khoảng 8 giờ và khoảng 24 giờ. Kết quả khuếch đại PCR theo thời gian thực như được minh họa trong biểu đồ trong Fig. 5, biểu thị một cách bất ngờ sự cảm ứng của gen này gây ra bởi tín hiệu môi trường khác nhau dưới dạng các yếu tố vô sinh bất lợi. Hơn nữa, cũng bất ngờ thấy có sự điều hòa biệt hóa phiên mã của *OsHk3b* đối với độ mặn, hạn hán, ABA, nhiệt độ nóng và nhiệt độ lạnh. Sự tích lũy phiên mã của *OsHk3b* tăng

cùng với thời gian từ khoảng 8 giờ đến khoảng 24 giờ trong tất cả các điều kiện bất lợi như vậy, như đối với độ mặn (Fig. 5B, C), hạn hán (Fig. 5D, E), ABA (Fig. 5F, G), nhiệt độ nóng (Fig. 5H, I) và nhiệt độ lạnh (Fig. 5J, K), bằng cách đó biểu thị vai trò của gen này đối với nhiều yếu tố vô sinh bất lợi, và vì thế, biểu thị ưu thế của nó trong việc cải thiện sự chống chịu của các cây trồng đối với các yếu tố bất lợi khác nhau, đặc biệt là, nhiệt độ cao, nhiệt độ thấp, độ mặn cũng như hạn hán và v.v..

E) Cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ - ứng dụng gen *kinaza histidin* dạng lai được phân lập từ lúa IR64 trong việc cải thiện sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau trong các cây trồng mùa vụ

Để xác minh khả năng của gen *OsHk3b* trong việc cải thiện yếu tố bất lợi, cụ thể là sự chống chịu yếu tố vô sinh bất lợi trong các cây trồng (lúa biến đổi gen), cây lúa IR64 được biến nạp với gen *OsHk3b* dưới sự kiểm soát của trình tự khởi đầu phiên mã cơ định được chọn lọc một cách thích hợp bằng cách sử dụng pCAMBIA1304-*OsHk3b*, và để có sự so sánh, cây lúa IR64 cũng được biến nạp với vectơ đối chứng (VC không chứa gen *OsHk3b*).

Theo sáng chế, biến nạp IR64 thu được bằng cách tiệt trùng bề mặt các hạt IR-64 này (Fig. 6a) và quá trình chuyển vào các môi trường tạo thể sần để tạo ra thể sần, thể sần phát triển này (Fig. 6b) sau đó được nuôi cấy thêm và lại được giữ trong các môi trường tạo thể sần trong khoảng từ 5 đến 7 ngày (Fig. 6c), các thể sần của cây lúa này được đồng chuyển nhiễm với chủng *Agrobacterium* LBA4404, chứa pCAMBIA1304-*OsHk3b* (Fig. 6d), thể sần của cây lúa bị đồng chuyển nhiễm này được giữ thêm để đồng nuôi cấy trong khoảng từ 2 đến 3 ngày (Fig. 6e), *Agrobacterium* phát triển quá mức (trên thể sần của cây lúa) được rửa bằng kháng sinh xefotaxim (Fig. 6f), sau đó thể sần này của lúa đã rửa được chuyển trên đĩa chọn lọc để phát triển thể sần của cây lúa được biến nạp (Fig. 6g), thể sần của cây lúa được biến nạp được nuôi cấy trên môi trường tái sinh (Fig. 6h) và sau đó được cấy chuyển trên các môi trường tái sinh mới (Fig. 6i), lúa được tái sinh được chuyển vào các ống nuôi cấy để phát triển hoàn chỉnh (Fig. 6j), sau đó lúa phát triển hoàn chỉnh này được chuyển ra bình đất nung và được trồng trong nhà kính để phát triển thành cây lúa IR64 biến đổi gen hoàn chỉnh (Fig. 6k).

Để xác minh chức năng tiềm tàng của gen *OsHk3b* trong việc cải thiện sự chống chịu yếu tố bất lợi trong lúa, thử nghiệm phân tích đĩa lá được thực hiện. Trong phân tích này, các đĩa lá được cắt từ các thực vật khác nhau và được ủ trong dung dịch có độ mặn cao (NaCl 200mM), và đối chứng cũng được phát triển khi bổ sung nước bình thường thay vì bổ sung nước muối. Sau khi ủ khoảng 96 giờ, tiến hành so sánh các đĩa này và đánh giá khả năng sống sót tổng thể của chúng (Fig 7A), sự tính toán chất diệp lục đối với các mẫu này cũng được thực hiện và các kết quả này được thể hiện trong Fig. 7B. Phân tích này biểu thị các cây lúa IR64 biến đổi gen (*OsHk3b* biểu hiện vượt trội) thể hiện quá trình bị làm trắng giảm một cách tương đối, thậm chí trong các điều kiện đối chứng (không có độ mặn bất lợi) trong T9 (Fig. 7A5) T29 (Fig. 7A7) khi được so sánh với IR64 không được biến nạp, nghĩa là, WT (Fig. 7A1) và VC (Fig. 7A3). Tương tự, chất diệp lục lưu giữ trong các cây lúa IR64 biến đổi gen T9 (Fig. 7B6) và T23 (Fig. 7B8) cũng được quan sát thấy nhiều hơn trong các cây không biến đổi gen tương ứng của nó, WT (Fig. 7B2) và VC (Fig. 7B4) trong độ mặn bất lợi, khẳng định là biểu hiện vượt trội của gen *OsHk3* trong cây lúa biến đổi gen làm cho chúng sống sót tốt hơn trong yếu tố vô sinh bất lợi, đặc biệt là độ mặn.

F) Khẳng định về các cây lúa biến đổi gen *OsHk3b*:

Để khẳng định sự cài nhập của gen *OsHk3b* vào hệ gen của các dòng IR64 biểu hiện vượt trội, PCR của mẫu mô được thực hiện bằng cách sử dụng mỗi xuôi đặc hiệu cho gen *OsHk3b* và mỗi ngược đặc hiệu cho vector (pCAMBIA1304). Sự khuếch đại này thể hiện bằng kích thước 1,4 kb trên các giếng số 4, 7, 8, 9, 10, 11, 18, 19, 23, 32, thể hiện sự cài nhập thành công gen chuyển *OsHk3b* vào trong hệ gen của cây lúa IR64 biến đổi gen này (Fig. 8).

G) Các dòng lúa biến đổi gen (T₁) thể hiện sự chống chịu đối với độ mặn bất lợi trong quá trình nảy mầm của hạt

Các hạt IR64 dạng tự nhiên (WT) và *OsHk3b* biểu hiện vượt trội được giữ trong đĩa petri chứa bông được bão hoà bởi ½ Yoshida chứa NaCl 200mM (độ mặn bất lợi). Các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng tỷ lệ nảy mầm các hạt trong NaCl 200mM là nhiều hơn trong trường hợp các dòng biểu hiện vượt trội *OsHk3b* so với các hạt dạng tự nhiên (Fig. 2A). Khi chiều dài rễ và thân trong các cây trồng từ hạt nảy mầm được

đo sau ngày phát triển thứ tư, các tác giả bất ngờ phát hiện ra rằng cả chiều dài rễ và thân là dài hơn trong các dòng biểu hiện vượt trội, nhưng chiều dài này kém hơn trong dạng tự nhiên (Fig. 2B). Để xác định các ion K^+ và Na^+ có sẵn trong các thực vật biến đổi gen này, các tác giả đánh giá lượng ion có sẵn bằng máy quang kế ngọn lửa (flame photometer) và thấy rằng các thực vật biến đổi gen biểu hiện vượt trội duy trì tỷ lệ K^+/Na^+ lớn hơn so với các thực vật dạng tự nhiên (Fig. 2C). Phân tích này biểu thị là biểu hiện vượt trội *OsHk3b* trong cây lúa cho phép chống chịu độ mặn bất lợi đối với quá trình nảy mầm của các hạt.

H) Cây trồng từ hạt biến đổi gen biểu hiện vượt trội *OsHk3b* được thích ứng tốt hơn đối với độ mặn bất lợi khi được so sánh với WT

Cây lúa non biến đổi gen (T1) được sử dụng để tiến hành thử nghiệm thêm sự chống chịu đối với độ mặn. Cây trồng từ hạt bảy ngày tuổi được chuyển vào môi trường 1/2 Yoshida chứa NaCl 200mM, trong khi các cây trồng từ hạt được phát triển trong môi trường 1/2 Yoshida không chứa NaCl được sử dụng như đối chứng. Các bức ảnh được chụp sau mười ngày chịu yếu tố bất lợi. Các tác giả thấy cây lúa biểu hiện *OsHk3b* có biểu hiện vượt trội khả năng kháng lại độ mặn bất lợi bất ngờ (Fig. 3B) và duy trì chất diệp lục nhiều hơn (Fig. 3C) cây lúa dạng tự nhiên trong điều kiện độ mặn bất lợi. Thậm chí trong các điều kiện không bất lợi, cây lúa biểu hiện vượt trội *OsHk3b* cho thấy là phát triển hơn các dòng *OsHk3b* dạng tự nhiên (Fig. 3A). Phân tích này biểu hiện thêm là, biểu hiện vượt trội *OsHk3b* trong cây lúa cung cấp sự chống chịu độ mặn bất lợi đối với các cây trồng từ hạt.

Chú thích chi tiết của các hình kèm vẽ theo:

Fig. 1A: Các trình tự môi được sử dụng để phân lập gen *OsHk3b*.

Fig. 1B: Các điều kiện cho phản ứng chuỗi polymeraza (PCR).

Fig. 1C: Điện di sản phẩm phản ứng chuỗi polymeraza trên gel agarosa, thể hiện sản phẩm *OsHk3b* khuếch đại có kích thước 2,6Kb (một cách chính xác 2598 bp).

Fig. 2A: Trình tự gen hoàn chỉnh ORF của *OsHk3b* là 2598 bp (được nộp cho NCBI có số truy cập Genbank là Bankit 1121378 FJ004641).

Fig. 2B: Trình tự axit amin hoàn chỉnh, dự kiến đối với protein được mã hóa bởi ORF của *OsHk3* mà protein này là 95,9 kDa. Vùng truyền tín hiệu có gốc histidin bảo thủ tại vị trí 291 (H, được thể hiện màu đỏ). Vùng nhận tín hiệu có gốc Aspartat bảo thủ tại vị trí 771 (D, được thể hiện màu xanh). Trình tự được nộp cho NCBI có số truy cập Genbank là Bankit 1121378 FJ004641.

Fig. 3A: Kháng định quá trình nhân dòng *OsHk3* trong vector pYES2: Cắt giới hạn plasmit pYES2-*OsHk3b* bằng *SphI* để kháng định chiều ORF của *OsHk3b*; M: thang chuẩn ADN 1kb; 1,2,3,4 và 5 là plasmit pYES2-*OsHk3b*; 6: pYES2 và 7: plasmit pYES2-*OsHk3b* không bị cắt. Giản đồ mô tả pYES2-*OsHk3b* được thể hiện phía trên hình vẽ.

Fig. 3B: Kháng định quá trình nhân dòng *OsHk3b* trong vector pCAMBIA1304: Cắt giới hạn plasmit pCAMBIA1304-*OsHk3b* bằng *SphI* để kháng định chiều ORF của *OsHk3b*; M: thang chuẩn ADN 1kb; 1,2,3 và 4: plasmit pCAMBIA1304-*OsHk3b*; 5: pCAMBIA1304 và 6: plasmit pCAMBIA1304-*OsHk3b* không bị cắt. Giản đồ mô tả pCAMBIA1304-*OsHk3b* được thể hiện phía trên hình vẽ.

Fig. 4: Bổ sung chức năng trong thể đột biến HS13 miễn cảm với thẩm thấu đối với nhiệt độ trong nấm men *SLN1* bằng ORF của *OsHk3b* trong cây lúa. Bổ sung đột biến bằng biểu hiện ORF của *OSHK3B*; Độ nhạy của các chủng nấm men được nuôi cấy tại 28°C, 37°C trong ba ngày trên các môi trường YPD bình thường và YPD có NaCl 200mM (môi trường có muối).

Các chủng được sử dụng trong thử nghiệm này:

WT, nấm men dạng tự nhiên;

HS13, thể đột biến *sln1-ts*;

VC, HS13 chỉ mang vector (pYES2);

OSHK3a và *OsHk3b*, HS13 mang pYES2-*OsHk3b* biểu hiện;

SLN1, HS13 mang alen *sln1* biểu hiện dạng tự nhiên;

HK3H*, HS13 mang pYES2-*OsHk3b* bị đột biến histidin (*OsHk3H291V*) và

HK3D*, HS13 mang pYES2-*OsHk3b* bị đột biến aspartat (*OsHk3D772E*).

4A: Sự duy trì các chủng nấm men khác nhau trên môi trường YPD tại 28°C.

4B: Sự duy trì các chủng nấm men khác nhau trên môi trường YPD tại 28°C.

4C: Sự duy trì các chủng nấm men khác nhau trong môi trường độ mặn bất lợi (YPD chứa NaCl 200mM) tại 28°C;

4D: Sự duy trì các chủng nấm men khác nhau trong môi trường độ mặn bất lợi (YPD chứa NaCl 200mM) tại 28°C;

4E: Giải đồ mô tả các chủng nấm men khác nhau được sử dụng để cấy trên 4A, 4B, 4C và 4D.

Fig. 5: Biểu đồ thể hiện sự cảm ứng *OsHk3b* bởi các yếu tố vô sinh bất lợi khác nhau trong cây lúa. Trục X có các mẫu khác nhau; trục Y thể hiện sự biểu hiện tương đối của mARN. Phân tích qRT-PCR được thực hiện bằng cách sử dụng cADN được tổng hợp từ mARN của IR64 (IR) trong các điều kiện bất lợi S (NaCl 200mM), D (bị mất nước), ABA (axit abscisic 100uM), nhiệt độ nóng (42°C) và nhiệt độ lạnh (4°C) tại 8 (giờ) và 24 (24giờ) cùng với các mẫu C (đối chứng).

Fig. 6: Sự biến nạp và tái sinh *Oryza sativa* IR64. a. Các hạt lúa IR-64; b. Tạo thể sần của lúa trên các môi trường tạo thể sần; c. thể sần của lúa được nuôi cấy, sau đó được giữ trên các môi trường tạo thể sần trong 5-7 ngày; d. đồng chuyển nhiễm thể sần của cây lúa với chủng *Agrobacterium* LBA4404 chứa cấu trúc gen pCAMBIA1304-*OsHk3b*; e. đồng nuôi cấy thể sần của cây lúa bị đồng chuyển nhiễm; f. rửa *Agrobacterium* phát triển quá mức bằng kháng sinh xefotaxim; g. chuyển thể sần của lúa đã được rửa vào đĩa chọn lọc; h. thể sần của lúa biến nạp được giữ trên môi trường tái sinh; i. lúa non tái sinh được chuyển vào môi trường tái sinh mới; j. chuyển cây lúa tái sinh hoàn toàn vào các ống nuôi cấy để làm tăng tính chịu đựng; k. chuyển cây lúa từ bước j vào bình đất nung và được trồng trong nhà kính.

Fig. 7A: Thử nghiệm đĩa lá. Thể hiện tốc độ bị làm trắng của các mẫu lá khác nhau trong môi trường đối chứng và độ mặn bất lợi.

Fig. 7B: Hàm lượng chất diệt lục tổng số. Trục X: các mẫu khác nhau; Y: trục hàm lượng μg chất diệt lục tổng số trong một gram trọng lượng lá tươi

WT, IR64.

VC, IR64 được biến nạp với vectơ không chứa gen *OsHk3b*;

T9, IR64 được biến nạp với vectơ chứa gen *OsHk3b* (cây lúa số 9);

T23, IR64 được biến nạp với vectơ chứa gen *OsHk3b* (cây lúa số 23).

Fig. 8: minh họa sự khẳng định các cây IR64-*OsHk3b* được tái sinh bằng PCR từ mô. (A) Khuếch đại PCR được thực hiện bằng cách sử dụng mô lúa non tái sinh như khuôn và mỗi xuôi đặc hiệu cho vectơ và mỗi ngược đặc hiệu cho gen. M: ADN chuẩn; 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 19, 23, 32 là các cây trồng từ hạt khác nhau chuyển gen *OsHk3b* được sử dụng cho PCR từ mô, IR: IR64 không được biến nạp, nghĩa là các thực vật dạng tự nhiên và +ve: pCAMBIA-*OsHk3b* được sử dụng làm khuôn.

Fig. 9: minh họa sự khẳng định sự chống chịu nhiều yếu tố bất lợi khác nhau bằng thử nghiệm nảy mầm đối với các hạt IR64-*OsHk3b* chuyển gen (T_1) trong sự có mặt của NaCl 200mM. (A) Các hạt WT: Dạng tự nhiên; OE1: dòng biểu hiện vượt trội *OsHk3b*, được giữ trong các môi trường 1/2 Yoshida chứa NaCl 200mM; (B) Đo độ dài thân; (C) Đo độ dài rễ; (E) Đo tỷ số K^+/Na^+ . Dữ liệu được lấy sau 96 giờ chịu độ mặn bất lợi.

Fig. 10: minh họa sự phát triển các cây trồng từ hạt chuyển gen IR64-*OsHk3b* (T_1) trong điều kiện đối chứng (không bị độ mặn) và điều kiện độ mặn bất lợi và đo chất diệp lục của chúng. (A) trong môi trường 1/2 Yoshida bình thường (B) trong môi trường 1/2 Yoshida bổ sung NaCl (200mM). WT: IR64 dạng tự nhiên, OE1: dòng biểu hiện vượt trội *OsHk3b*. (C) đo chất diệp lục từ các cây trồng từ hạt chịu độ mặn bất lợi, cây trồng từ hạt đối chứng. Cây trồng từ hạt 7 ngày tuổi phát triển trong các điều kiện đối chứng là đối tượng chịu được với độ mặn bất lợi (NaCl 200mM) trong 10 ngày, sau đó ảnh được chụp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai vào plasmit tái tổ hợp, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- i) phân lập cADN từ giống lúa cv IR64;
- ii) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng chuỗi polymeraza bao gồm:
 - a) cADN đã được phân lập của giống lúa cv IR64; và
 - b) môi xuôi chứa SEQ ID NO:1; và
 - c) môi ngược chứa SEQ ID NO:2;
- (iii) thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) bằng cách sử dụng hỗn hợp của bước (ii) để sản xuất gen kinaza histidin dạng lai (*OsHk3b*) dạng lai được khuếch đại chứa SEQ ID NO:3 của cADN của giống lúa IR64; và
- (iv) nhân dòng gen (*OsHk3b*) được khuếch đại của bước (iii) vào plasmit tái tổ hợp; trong đó trong quá trình PCR nêu trên bước gắn môi được thực hiện ở khoảng 55°C.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước phân lập cADN từ giống lúa cv IR64 bao gồm các bước:

- a) phân lập ARN tổng số từ mô lá chịu độ mặn bất lợi của giống lúa cv IR64;
- b) phân lập mARN từ ARN tổng số bằng cách sử dụng các hạt streptavidin thuận từ và môi d(T)₂₀ ngắn được đánh dấu biotin; và
- c) tổng hợp mạch cADN thứ nhất từ mARN.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó quá trình thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) bao gồm các bước:

- i) làm biến tính hỗn hợp phản ứng PCR ban đầu ở khoảng 94°C trong khoảng 5 phút;
- ii) làm biến tính hỗn hợp phản ứng từ bước i) ở khoảng 94°C trong khoảng 1 phút;
- iii) gắn môi hỗn hợp phản ứng từ bước ii) ở khoảng 55°C trong khoảng 1 phút;
- iv) tổng hợp hỗn hợp phản ứng từ bước iii) ở khoảng 72° trong khoảng 3 phút; và

v) tổng hợp lần cuối hỗn hợp phản ứng từ bước iv) ở khoảng 72°C trong khoảng 7 phút;

trong đó các bước biến tính, gắn nối và tổng hợp được lặp lại trong khoảng 34 chu kỳ.

4. Phương pháp nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai (*OsHk3b*) vào vectơ biểu hiện của nấm men, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(i) phân lập cADN từ giống lúa cv IR64;

(ii) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng chuỗi polymeraza bao gồm:

a) cADN đã được phân lập nêu trên của giống lúa cv IR64; và

b) mồi xuôi chứa SEQ ID NO: 1; và

c) mồi ngược chứa SEQ ID NO: 2;

(iii) thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng hỗn hợp của bước (ii) để sản xuất gen kinaza histidin dạng lai (*OsHk3b*) được khuếch đại chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 của cADN giống lúa cv IR64;

(iv) nhân dòng gen (*OsHk3b*) được khuếch đại trong bước (iii) vào plasmit tái tổ hợp,

(v) khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), gen (*OsHk3b*) được khuếch đại đã nhân dòng từ bước (iv) từ plasmit bằng cách xử lý plasmit với mồi xuôi *OsHk3b*SpeIF và mồi ngược *OsHk3b*SpeIR để tạo ra đoạn gen *OsHk3b* được khuếch đại; và

(vi) nhân dòng đoạn gen *OsHk3b* được khuếch đại chứa khung đọc mở hoàn chỉnh của của gen *OsHk3b* cùng với các vị trí Spa bổ sung vào vectơ biểu hiện của nấm men;

trong đó trong quá trình phản ứng PCR nêu trên, bước gắn nối được thực hiện ở khoảng 55°C.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó quá trình thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza để khuếch đại gen *OsHk3b* của bước (v) bao gồm các bước:

i) làm biến tính hỗn hợp phản ứng ban đầu bao gồm mồi xuôi *OsHk3b*SpeIF, mồi ngược *OsHk3b*SpeIR và plasmit của của gen *OsHk3b* chứa trình tự nêu trong SEQ

ID NO: 3 ở khoảng 94°C trong khoảng 5 phút;

ii) làm biến tính hỗn hợp phản ứng từ bước i) ở khoảng 94°C trong khoảng 1 phút;

iii) gắn môi hỗn hợp phản ứng từ bước ii) ở khoảng 55°C trong khoảng 1 phút;

iv) tổng hợp hỗn hợp phản ứng từ bước iii) ở khoảng 72°C trong khoảng 3 phút; và

v) tổng hợp lần cuối hỗn hợp phản ứng từ bước iv) ở khoảng 72°C trong khoảng 7 phút;

trong đó các bước biến tính, gắn môi và tổng hợp được lặp lại trong khoảng 34 chu kỳ.

6. Vector biểu hiện của nấm men được phân lập, trong đó vector này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

7. Phương pháp nhân dòng gen kinaza histidin dạng lai (*OsHk3b*) vào vector biểu hiện của thực vật, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(i) phân lập cADN từ giống lúa cv IR64;

(ii) chuẩn bị hỗn hợp phản ứng chuỗi polymeraza bao gồm:

a) cADN đã được phân lập nêu trên của giống lúa cv IR64; và

b) môi xuôi chứa SEQ ID NO: 1; và

c) môi ngược chứa SEQ ID NO: 2;

(iii) thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza bằng cách sử dụng hỗn hợp của bước (ii) để sản xuất gen kinaza histidin dạng lai (*OsHk3b*) được khuếch đại chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 của cADN của giống lúa cv IR64;

(iv) nhân dòng gen (*OsHk3b*) được khuếch đại của bước (iii) vào plasmit tái tổ hợp,

(v) khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), gen (*OsHk3b*) được khuếch đại đã nhân dòng từ plasmit này bằng cách xử lý plasmit với môi xuôi *OsHk3b*SpeIF và môi ngược *OsHk3b*SpeJR để tạo ra đoạn gen *OsHk3b* được khuếch đại; và

(vi) nhân dòng đoạn gen *OsHk3b* được khuếch đại chứa khung đọc mở hoàn chỉnh của của gen *OsHk3b* cùng với các vị trí Spa bổ sung vào vector biểu hiện của thực vật.

trong đó trong quá trình phản ứng PCR nêu trên, bước gắn môi được thực hiện ở khoảng 55°C.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó quá trình thực hiện phản ứng chuỗi polymeraza để khuếch đại gen *OsHk3b* của bước (v) bao gồm các bước:

(i) làm biến tính hỗn hợp phản ứng ban đầu bao gồm môi xuôi *OsHk3b*SpeJF, môi ngược *OsHk3b*SpeIR và plasmit của gen *OsHk3b* chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 ở khoảng 94°C trong khoảng 5 phút;

(ii) làm biến tính hỗn hợp phản ứng từ bước i) ở khoảng 94°C trong khoảng 1 phút;

(iii) gắn môi hỗn hợp phản ứng từ bước ii) ở khoảng 55°C trong khoảng 1 phút;

(iv) tổng hợp hỗn hợp phản ứng từ bước iii) ở khoảng 72°C trong khoảng 3 phút; và

(v) tổng hợp lần cuối hỗn hợp phản ứng từ bước iv) ở khoảng 72°C trong khoảng 7 phút;

trong đó các bước biến tính, gắn môi, và tổng hợp được lặp lại trong khoảng 34 chu kỳ.

9. Vectơ biểu hiện của thực vật được phân lập, trong đó vectơ này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<160> SỐ TRÌNH TỰ 8

<210> SEQ ID NO 1

<211> CHIỀU DÀI: 20

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Nhân tạo

<220> ĐẶC TÍNH:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi OSHkb3F

<400> TRÌNH TỰ: 1

atgacgttcg cgaggtacgc

20

<210> SEQ ID NO 2

<211> CHIỀU DÀI: 24

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Nhân tạo

<220> ĐẶC TÍNH:

<223> THÔNG TIN KHÁC: Đoạn mỗi OsHkb3R

<400> TRÌNH TỰ: 2

ctattcaact tggatcatgat ttgtg 24

<210> SEQ ID NO 3

<211> CHIỀU DÀI: 2598

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Oryza sativa

<400> TRÌNH TỰ: 3

atgacgttcg cgaggtacgc ggtgaggacg gcgttcgagc ggccgctgac gagcgggggtg	60
gcgtacgcgg tgcgggtgac gcacggcgag cgggagcatt tcgagcggca gcaggggtgg	120
acgatcaaga agatgtactc ctctccaac aagaagcagt cgtcgtcggg gccggggccg	180
ggggacgccg ccgtcgcgga gatccgggag ccgcgcgagg agtacgcccc ggtcatcttc	240
gcccaggacg cctacaagca cgtcatctcc ttcgacatgc tctccgggaa tgaggatcgg	300
aaaaacatac tatactctag gaaatctggc aagggtgtcc tgactgctcc tttcaagcta	360
ctgaataatc gcctcggagt aatctcgaca tacactgttt ataagtctga gctccctgca	420
aatgccaggc cacatgaacg catccaagcc gcgattggct atttgggcgg catatttgac	480
atacaagcac tcgtcgaaaa gttgctcaaa caactcgcga gccaggaatc catcatgggtg	540
aatgtgtatg atacgaccaa cgagaacccg atcagtatgt acggtgatga tactgggagt	600
ggcatgtgcc atgtcagcgt gctcaacttt ggtgatccat cgagaaagca tgagatgcac	660
tgcaggttcg aaaaaagcc accatggcca tggctggcaa taacgtcatc gtttggaact	720
cttgtgattg ctttactgac tggtcacata tttcaagcta ctgtccatcg gattgctaaa	780
gttgaagatg atttccacaa gatgagcgaa ctcaagaagc gtgcagaaga tgcagacgtc	840
gcaaagtcac agttcttggc tactgtttca catgagatca gaactccaat gaatgggtgtt	900
ctagggatgc tccaaatgct catggatact gatttggaca cgacgcagca ggactatgtt	960
agaactgccc aagctagtgg aaaagctttg gtctctctca tcaatgaggt tcttgatcag	1020

gcaaagattg agtctggttaa acttgagctc gagacggtgc cctttgatct tagaacagtt 1080
 tgtgacgaca ttttatctct gttttgtggg aaagctcagg agaaaggact ggagtttagca 1140
 gtgtatgtct cggatcaagt tccacagata cttattggcg atcctggcag gataagacaa 1200
 atcattacga atcttgtcgg gaactccata aagttcacag agagagggca tatataacctg 1260
 acagttcatg tagttgaaga ggtcatgagt tgtttggagg tagagacagg aattcagaac 1320
 acaaacactt taagtggcta tccagtagcc aacagaagat gtagctggga gagcattcgg 1380
 cttttcaaca gagaattaca ctcatctgag aagtcttttg cgcccatcgc atctgattca 1440
 ataagcttgg ttatatctgt tgaagatact ggcgtcggca tcccatttga agcccaatcc 1500
 cgtgtgttca cccctttcat gcaggtaggt ccatccattg cccgcatcca tgggggcact 1560
 ggcatggat taagcatcag caagtgcttg gttggtctca tgaagggaga aatcggtttt 1620
 gcaagtaagc cccatgttgg ttctactttc accttcaccg cggtgcttat gagggcacac 1680
 tgcaaaggaa atgacatcaa atcatcagaa tttaaagggg tcaatgcatt ggttgttgat 1740
 cataggccag tccgtgcaaa ggttaccaag tatcacttgc aaagacttgg agttaagacc 1800
 gaactgacag ctgagctaaa tcagttcatt tctaaattaa actctggatc actgactgca 1860
 aagctagtgc taatagacaa ggaaacctgg cttaaggaat cccattgcac gcctcttctg 1920
 gttaacaaat tgaggaataa tgacaagcca gactctccta agttatttct tttggggagc 1980
 tctgcaagtt ctccaaggg cggttcagat acatccaggg aacataactt gaatgtaata 2040
 atgaagccgc ttcgtgcaag catgcttcag gtctcactac gacgagcact aggtggggtc 2100
 gataaggtgc actgcaggaa tggagtagtt ggcaattcaa cattgggcag ccttcttcac 2160
 aagaagcaaa tcattgttgt cgacgacaat atcgttaacc tgaaggtggc tgggtgctctt 2220
 aagaagtatg gtgccgaagt tacttgtgca gacagcggga aaaaagcaat cacattgcta 2280
 aaacccccgc acaattttga tgcttgtttc atggacatac agatgccaga aatggatggg 2340
 tttgaagcca ctagaaggat tagagtgatg gaaagagatc taaatgagcg aatagaacgc 2400
 ggagagggcg caccagaatg tgctagtatt cagaggtggc gaactcctat attggcgatg 2460
 acggcggatg ttatacaggc aacacacgag gagtgctga aaagcgaaat ggatggctat 2520
 gtctccaagc catttgaagg ggagcagctg tacagcgaag tagcgcggtt tttccaaaat 2580
 catgaccaag ttgaatag 2598

<210> SEQ ID NO 4

<211> CHIỀU DÀI: 865

<212> LOẠI: PRT

<213> SINH VẬT: *Oryza sativa*

<400> TRÌNH TỰ: 4

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

19555

Ala	Gln	Asp	Ala	Tyr	Lys	His	Val	Ile	Ser	Phe	Asp	Met	Leu	Ser	Gly
85								90				95			
Asn	Glu	Asp	Arg	Lys	Asn	Ile	Leu	Tyr	Ser	Arg	Lys	Ser	Gly	Lys	Gly
100								105				110			
Val	Leu	Thr	Ala	Pro	Phe	Lys	Leu	Leu	Asn	Asn	Arg	Leu	Gly	Val	Ile
115								120				125			
Ser	Thr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Lys	Ser	Glu	Leu	Pro	Ala	Asn	Ala	Arg	Pro
130								135				140			
His	Glu	Arg	Ile	Gln	Ala	Ala	Ile	Gly	Tyr	Leu	Gly	Gly	Ile	Phe	Asp
145								150				155			
Ile	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	Lys	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu	Ala	Ser	Gln	Glu
165								170				75			
Ser	Ile	Met	Val	Asn	Val	Tyr	Asp	Thr	Thr	Asn	Glu	Asn	Pro	Ile	Ser
180								185				190			
Met	Tyr	Gly	Asp	Asp	Thr	Gly	Ser	Gly	Met	Cys	His	Val	Ser	Val	Leu
195								200				205			
Asn	Phe	Gly	Asp	Pro	Ser	Arg	Lys	His	Glu	Met	His	Cys	Arg	Phe	Glu
210								215				220			
Lys	Lys	Pro	Pro	Trp	Pro	Trp	Leu	Ala	Ile	Thr	Ser	Ser	Phe	Gly	Thr
225								230				235			
Leu	Val	Ile	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	His	Ile	Phe	Gln	Ala	Thr	Val	His
245								250				255			
Arg	Ile	Ala	Lys	Val	Glu	Asp	Asp	Phe	His	Lys	Met	Ser	Glu	Leu	Lys
260								265				270			
Lys	Arg	Ala	Glu	Asp	Ala	Asp	Val	Ala	Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Ala	Thr
275								280				285			
Val	Ser	His	Glu	Ile	Arg	Thr	Pro	Met	Asn	Gly	Val	Leu	Gly	Met	Leu
290								295				300			
Gln	Met	Leu	Met	Asp	Thr	Asp	Leu	Asp	Thr	Thr	Gln	Gln	Asp	Tyr	Val
305								310				315			
Arg	Thr	Ala	Gln	Ala	Ser	Gly	Lys	Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ile	Asn	Glu
325								330				335			
Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Lys	Ile	Glu	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Leu	Glu	Thr
340								345				350			
Val	Pro	Phe	Asp	Leu	Arg	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe
355								360				365			
Cys	Gly	Lys	Ala	Gln	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Ala	Val	Tyr	Val	Ser
370								375				380			
Asp	Gln	Val	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Gly	Asp	Pro	Gly	Arg	Ile	Arg	Gln
385								390				395			
Ile	Ile	Thr	Asn	Leu	Val	Gly	Asn	Ser	Ile	Lys	Phe	Thr	Glu	Arg	Gly
405								410				415			
His	Ile	Tyr	Leu	Thr	Val	His	Val	Val	Glu	Glu	Val	Met	Ser	Cys	Leu
420								425				430			
Glu	Val	Glu	Thr	Gly	Ile	Gln	Asn	Thr	Asn	Thr	Leu	Ser	Gly	Tyr	Pro
435								440				445			
Val	Ala	Asn	Arg	Arg	Cys	Ser	Trp	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Phe	Asn	Arg
450								455				460			
Glu	Leu	His	Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Phe	Ala	Pro	Ile	Ala	Ser	Asp	Ser
465								470				475			
Ile	Ser	Leu	Val	Ile	Ser	Val	Glu	Asp	Thr	Gly	Val	Gly	Ile	Pro	Phe
485								490				495			

Glu	Ala	Gln	Ser	Arg	Val	Phe	Thr	Pro	Phe	Met	Gln	Val	Gly	Pro	Ser		
			500					505					510				
Ile	Ala	Arg	Ile	His	Gly	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys		
		515					520					525					
Cys	Leu	Val	Gly	Leu	Met	Lys	Gly	Glu	Ile	Gly	Phe	Ala	Ser	Lys	Pro		
	530					535					540						
His	Val	Gly	Ser	Thr	Phe	Thr	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Met	Arg	Ala	His		
545					550				555						500		
Cys	Lys	Gly	Asn	Asp	Ile	Lys	Ser	Ser	Glu	Phe	Lys	Gly	Ile	Asn	Ala		
			565						570					575			
Leu	Val	Val	Asp	His	Arg	Pro	Val	Arg	Ala	Lys	Val	Thr	Lys	Tyr	His		
			580					585					590				
Leu	Gln	Arg	Leu	Gly	Val	Lys	Thr	Glu	Leu	Thr	Ala	Glu	Leu	Asn	Gln		
	595						600					605					
Phe	Ile	Ser	Lys	Leu	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Thr	Ala	Lys	Leu	Val	Leu		
	610					615					620						
Ile	Asp	Lys	Glu	Thr	Trp	Leu	Lys	Glu	Ser	His	Cys	Thr	Pro	Leu	Leu		
625					630				635						640		
Val	Asn	Lys	Leu	Arg	Asn	Asn	Asp	Lys	Pro	Asp	Ser	Pro	Lys	Leu	Phe		
				645					650					655			
Leu	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Lys	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Ser		
		660						665					670				
Arg	Glu	His	Asn	Leu	Asn	Val	Ile	Met	Lys	Pro	Leu	Arg	Ala	Ser	Met		
	675					680						685					
Leu	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Val	Asp	Lys	Val	His		
	690					695					700						
Cys	Arg	Asn	Gly	Val	Val	Gly	Asn	Ser	Thr	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	His		
705					710					715					720		
Lys	Lys	Gln	Ile	Ile	Val	Val	Asp	Asp	Asn	Ile	Val	Asn	Leu	Lys	Val		
			725						730					735			
Ala	Gly	Ala	Leu	Lys	Lys	Tyr	Gly	Ala	Glu	Val	Thr	Cys	Ala	Asp	Ser		
		740						745					750				
Gly	Lys	Lys	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Pro	Pro	His	Asn	Phe	Asp	Ala		
	755					760						765					
Cys	Phe	Met	Asp	Ile	Gln	Met	Pro	Glu	Met	Asp	Gly	Phe	Glu	Ala	Thr		
	770					775					780						
Arg	Arg	Ile	Arg	Val	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Asn	Glu	Arg	Ile	Glu	Arg		
785					790					795					800		
Gly	Glu	Ala	Pro	Pro	Glu	Cys	Ala	Ser	Ile	Gln	Arg	Trp	Arg	Thr	Pro		
			805						810						815		
Ile	Leu	Ala	Met	Thr	Ala	Asp	Val	Ile	Gln	Ala	Thr	His	Glu	Glu	Cys		
		820						825						830			
Leu	Lys	Ser	Glu	Met	Asp	Gly	Tyr	Val	Ser	Lys	Pro	Phe	Glu	Gly	Glu		
	835						840						845				
Gln	Leu	Tyr	Ser	Glu	Val	Ala	Arg	Phe	Phe	Gln	Asn	His	Asp	Gln	Val		
	850					855						860					
Glu																	
865																	

<210> SEQ ID NO 5

<211> CHIỀU DÀI: 29

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Nhân tạo

<220> ĐẶC TÍNH:

<223> THÔNG TIN KHÁC: OSHKb3HisMUTF

<400> TRÌNH TỰ: 5

ggctactggtt tcagttgaga tcagaactc 29

<210> SEQ ID NO 6

<211> CHIỀU DÀI: 28

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Nhân tạo

<220> ĐẶC TÍNH:

<223> THÔNG TIN KHÁC: OSHKb3HisMUTR

<400> TRÌNH TỰ: 6

agttctgatc tcaactgaaa cagtagcc

28

<210> SEQ ID NO 7

<211> CHIỀU DÀI: 31

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Nhân tạo

<220> ĐẶC TÍNH:

<223> THÔNG TIN KHÁC: OSHKb3AspMUTF

<400> TRÌNH TỰ: 7

gatgcttggtt tcatgctcat acagatgcca g

31

<210> SEQ ID NO 8

<211> CHIỀU DÀI: 31

<212> LOẠI: ADN

<213> SINH VẬT: Nhân tạo

<220> ĐẶC TÍNH:

<223> THÔNG TIN KHÁC: OSHKb3AspMUTR

<400> TRÌNH TỰ: 8

ctggcatctg tatgagcatg aaacaagcat c

31

Tên môi	Các trình tự môi	
OsHk3bF	5'ATGACGTTTCGGGAGGTACGC3'	(SEQ ID NO: 1)
OsHk3bR	5'CTATTCAACTTGGTCATGATTTTG3'	(SEQ ID NO: 2)

Fig.1A

Các bước	Nhiệt độ	Thời gian	Số chu kỳ
Biến tính ban đầu	94 ^o C	5 ph	1
Biến tính	94 ^o C	1 ph	34
Gắn môi	55 ^o C	1 ph	
Tổng hợp	72 ^o C	3 ph	
Tổng hợp cuối	72 ^o C	7 ph	1

Fig.1B



Fig.1C

ATGACGTTCCGCGAGGTACGCGGTGAGGACGGCGTTCCGAGCGCGCGCTGACGAGCGG
 GGTGCGGTACGCGGTGCGGGTGACGCACGGCGAGCGGGAGCATTTCGAGCGGCAGC
 AGGGGTGGACGATCAAGAAGATGTACTCCTCCTCCAACAAGAAGCAGTCGTCTCG
 GGGCGGGGCGGGGGACGCGCGCTCGCGGAGATCCGGGAGCCCGCCGAGGAGTA
 CGCCCGGGTCATCTTGGCCAGGACGGCTACAAGCAGTCATCTCCTTCGACATGCTC
 TCCGGGAATGAGGATCGGAAAAACATACTATACTCTAGGAAATCTGGCAAGGGTGT
 CCTGACTGCTCCTTTCAAGCTACTGAATAATCGCCTCGGAGTAATCTCGACATACACT
 GTTTATAAGTCTGAGCTCCCTGCAAATGCCAGGCCACATGAACGCATCCAAGCCGCG
 ATTGGCTATTTGGGCGGCATATTTGACATACAAGCACTCGTCGAAAAGTTGCTCAAA
 CAACTCGCGAGCCAGGAATCCATCATGGTGAATGTGTATGATACGACCAACGAGAA
 CCGGATCAGTATGTACGCTGATGATGATCTGGGAGTGGCATGTGCCATGTACGCGTGT
 CAACTTTGGTGATCCATCGAGAAAAGCATGAGATGCATTGCAGGTTGCAAAAAGGCC
 ACCATGGCCATGGCTGGCAATAACGTCATCGTTTGGAACTCTTGTGATTGCTTTACTG
 ACTGGTCACATATTTCAAGCTACTGTCCATCGGATTGCTAAAGTTGAAGATGATTTC
 ACAAGATGAGCGAACTCAAGAAGCGTGCAAGATGCAGACGTCGCAAGTCAAG
 TTCTTGGCTACTGTTTACATGAGATCAGAACTCCAATGAATGGTGTCTAGGGATGC
 TCCAAATGCTCATGGATACTGATTGGACACGACGAGCAGGACTATGTTAGAACTG
 CCCAAGCTAGTGGAAAAGCTTTGGTCTCTCTCATCAATGAGGTTCTTGATCAGGCCAA
 AGATTGAGTCTGGTAAACITGAGCTCGAGACGGTGCCCTTTGATCTTAGAACAGTTT
 GTGACGACATTTTATCTCTGTTTTGTGGGAAAGCTCAGGAGAAAGGACTGGAGTTAG
 CAGTGTATGTCTCGGATCAAGTTCCACAGATACCTATTGGCGATCCTGGCAGGATAA
 GACAAATCATTACGAATCTTGTGGGAACTCCATAAAGTTACAGAGAGAGGGGCATA
 TATACCTGACAGTTTATGTAGTTGAAGAGGTCATGAGTTGTTTGGAGGTAGAGACAG
 GAATTCAGAACACAAACACTTTAAGTGGCTATCCAGTAGCCAACAGAAAGATGTAGCT
 GGGAGAGCATTTCGGCTTTTCAACAGAGAATTACACTCATCTGAGAACTCTTTTGGC
 CCATCGCATCTGATTCAATAAGCTTGTATATCTGTTGAAGATACTGGCGTCGGCAT
 CCCATTGAAAGCCCAATCCCGTGTGTACCCCTTTTCATGCAAGGTAGGTCCATCCATT
 GCGCGCATCCATGGGGCACTGGCATTGGATTAAAGCATCAGCAAGTGTCTGGTTGGT
 CTCATGAAGGGAGAAATCGGTTTTGCAAGTAAGCCCCATGTTGGTTCTACTTTACDCT
 TCACCGCGGTGCTTATGAGGGCACACTGCAAAGGAAATGACATCAAATCATCAGAAT
 TTAAAGGGATCAATGCATTGGTTGTTGATCATAGGCCAGTCCGTGCAAAGGTTACCA
 AGTATCACTTGCAAAGACTTGGAGTTAAGACCGAACTGACAGCTGAGCTAAATCAGT
 TCATTTCTAAATTAACCTCTGGATCACTGACTGCAAAGCTAGTGCTAATAGACAAGG
 AAACCTGGCTTAAGGAATCCCATTTGCACGCTCTTCTGTTTAAACAAATTGAGGAATA
 ATGACAAGCCAGACTCTCCTAAGTTATTTCTTTTGGGGAGCTCTGCAAGTTCTCCCAA
 GGGCGGTTTCAGATACATCCAGGGAACATAACTTGAATGTAATAATGAAGCGCTTCG
 TGCAAGCATGCTTCAGGTCTCACTACGACGAGCACTAGGTGGGTGCGATAAGGTGCA
 CTGCAAGGAATGGAGTAGTTGGCAATTCAACATTGGGCAGCTTCTTACAAAGAGCA
 AATCAATTGTGTGACGACAATATCGTTAACCTGAAGGTGGCTGGTCTCTTAAGAA
 GTATGCTGCGGAAGTTACTTGTGACAGACGCGGGAAGCAATCAGATTGCTAA
 AACCCCGCACAAATTTGATGCTTGTTCATGGACATACAGATGCCAGAAATGGATG
 GGTTTGAAGCCACTAGAAGGATTAGAGTGATGGAAAGAGATCTAAATGAGCGAATA
 GAACGCGGAGAGGGCCACCAGAATGTGCTAGTATTCAGAGGTGGCGAATCTCTAT
 ATTGGCGATGACGGCGGATGTTATACAGGCAACACAGGAGGTGCCTGAAAAGCG
 AAATGGATGGCTATGTCTCCAAAGCCATTTGAAGGGGAGCAGCTGTACAGCGAAGTA
 CGCGGTTTTTCCAAATCATGACCAAGTTGAATAG

Fig.2A

(SEQ ID NO: 3)

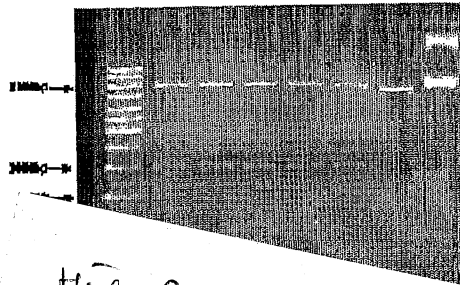
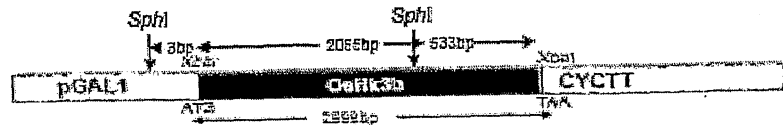
3/11

MTFARYAVRTAFERPLTSGVAYAVRVTHGEREHFERQQGWTIKKMYSSSNKK
 QSSSGPGPGDAAYAEIREPAEEYAPVIFAQDAYKHVISFDMLSGNEDRKNILYS
 RKSGKGVLTAPFKLLNNRLGVISTYTVYKSELPANARPHERIOAAIGYLGGFIDIQ
 ALVEKLLKQLASQESIMVNVYDTTNNENPISMYGDDTGSGMCHVSVLNFGDPSR
 KHEMHCRFEKKPPWPWLAITSSFGTLVIALLTGHIFQATVHRIAKVEDDFHKMS
 ELKKRAEDADVAKSQFLATVSHIIRTPMNGVLGMLQMLMDTDLDTTQQDYVRT
 AQASGKALVSLINEVLDQAKIESGKLELETVPFDLRTVCDDILSLFCGKAQEKGL
 ELAVVYSDQVPQILIGDPGRIRQIITNLVGNSIKFTERGHIYLTVHVVEEVMSCLE
 VETGIQNTNTLSGYPVANRRCSWESIRLFNRELHSSEKSFAPIASDSISLVISVED
 TGVGIPFEAQSRVFTPFMQVGPSIARIHGGTGIGLSISKCLVGLMKGEIGFASKP
 HVGSTFTFTAVLMRAHCKGNDIKSSEFKGINALVDHRPVRAKVTKYHLQRLGV
 KTELTAELNQFISKLNSSGLTAKLVLDKETWLKESHCTPLLVNKLNRNNDKPDSP
 KLFLLGSSASSPKGGSSTSRHNLNVIMKPLRASMLQVSLRRALGGVDKVHCR
 NGVVGNSLTLGSLHKKQIIVDDNIVNLKVAGALKKYGAEVTCADSGKKAITLLK
 PPHNFDACFMDIQMPMDGFEATRIRVMERDLNERIERGEAPPECASIORWR
 TPILAMTADVIQATHEECLKSEMDGYVSKPFEQEQLYSEVARFFQNHQVE

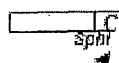
Fig.2B

(SEQ ID NO: 4)

4/11



Hình vẽ này mô, tuy nhiên
kết quả điện di thì rõ rệt
nên vẫn thể hiện được kết
thả nghiệm.



Đã lên hệ nhưng chủ đơn
ở có thể rõ hơn
⇒ đề nghị được chấp nhận

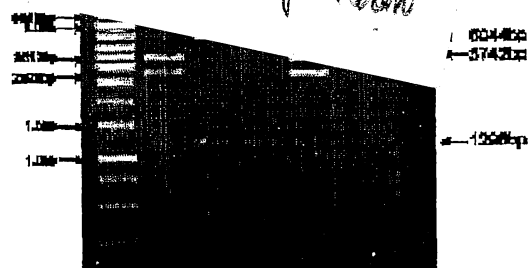
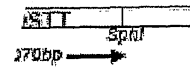


Fig.3B

5/11

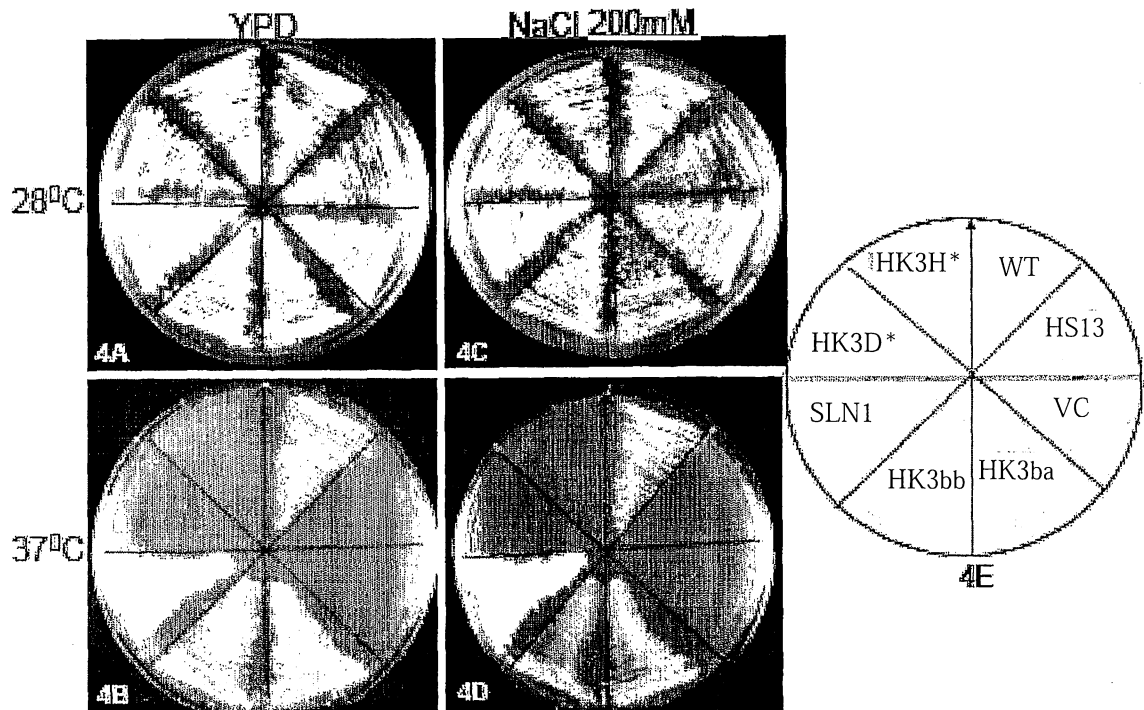


Fig.4

6/11

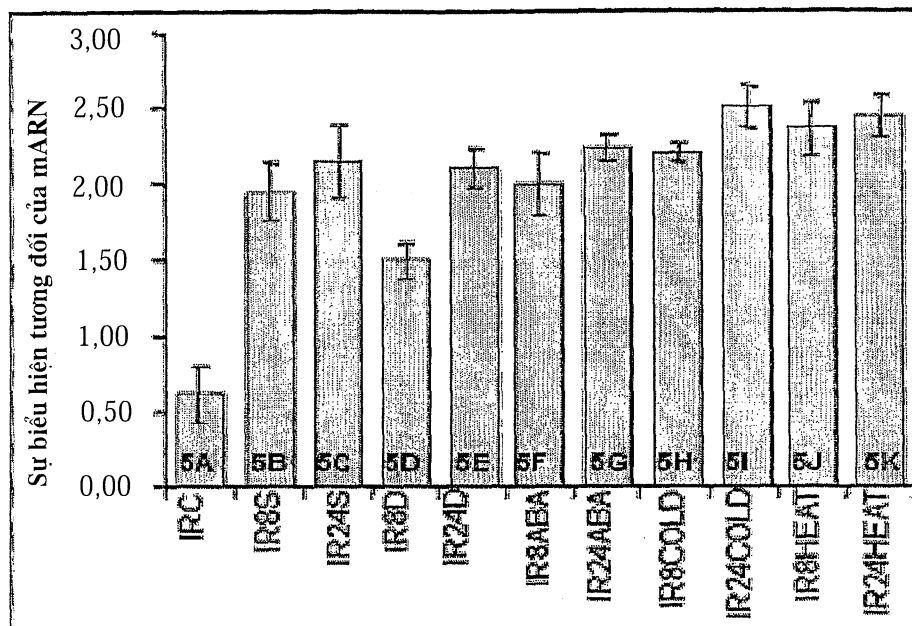


Fig.5

7/11

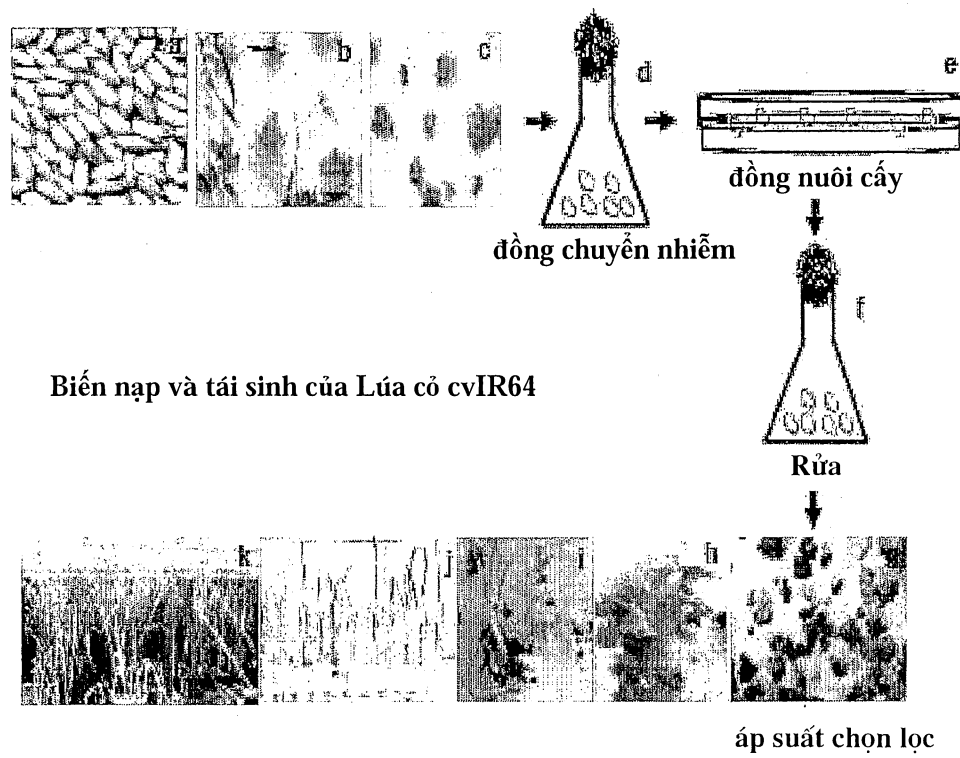


Fig. 6

8/11

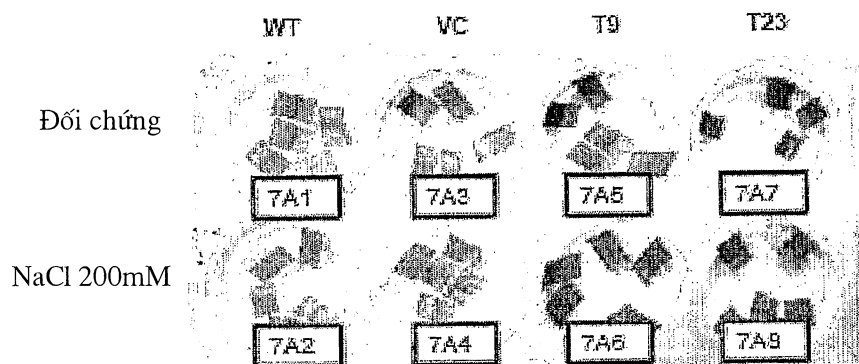


Fig.7A

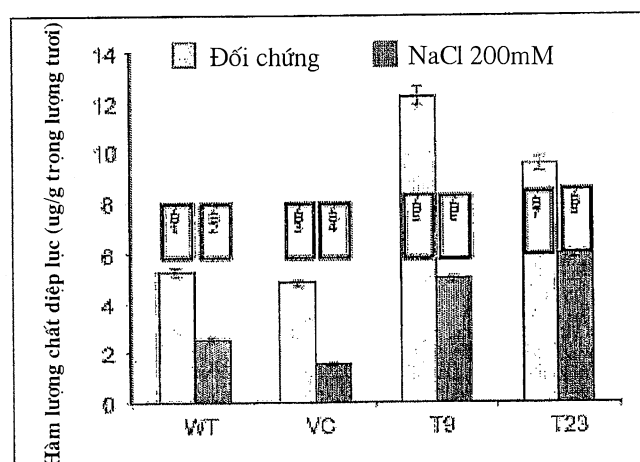


Fig.7B

9/11

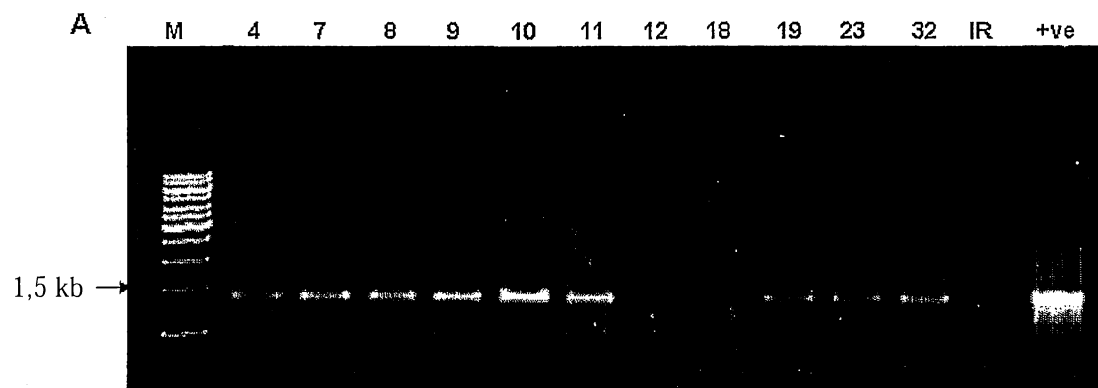


Fig.8

10/11

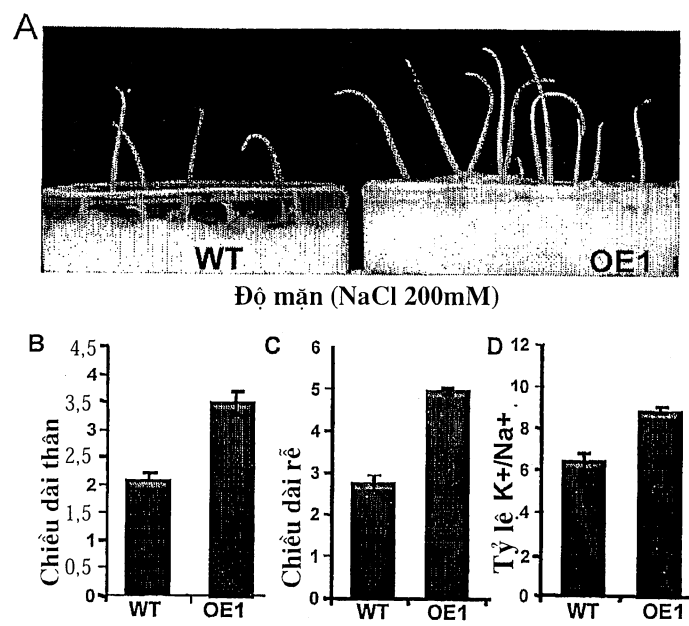
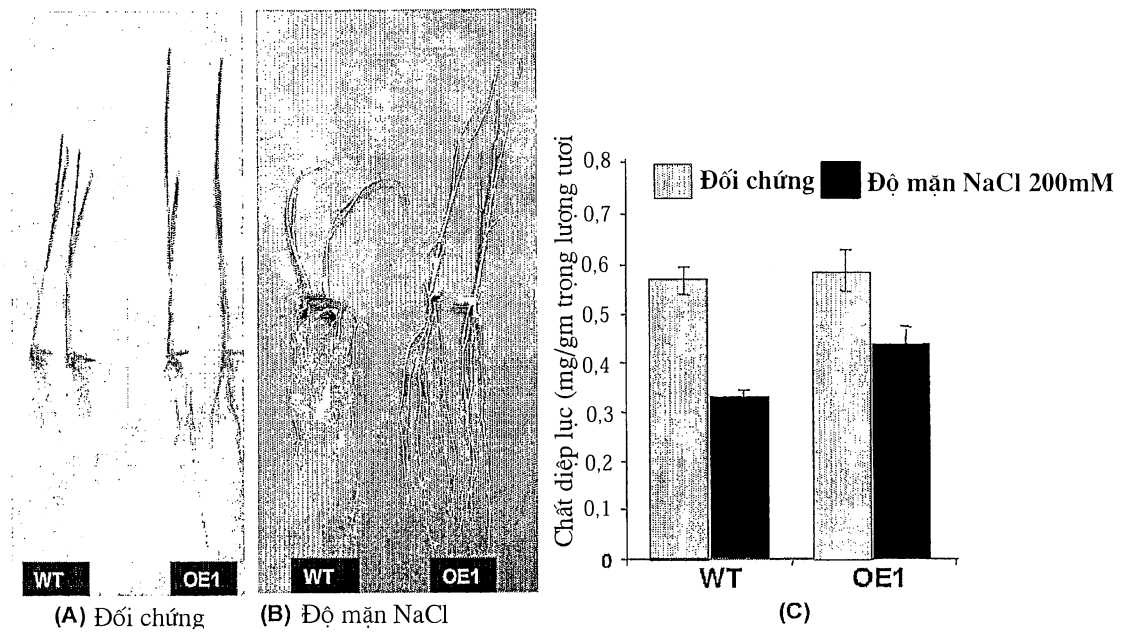


Fig.9

**Fig.10**