



(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) 
1-0019737

(51)⁷ **A01H 5/00, 5/10, C12N 15/52, 15/82,**
A23D 9/00, A23L 1/20, C12Q 1/68

(13) **B**

-
- (21) 1-2012-01068 (22) 26.08.2010
(86) PCT/US2010/046759 26.08.2010 (87) WO2011/034704 24.03.2011
(30) 61/243,227 17.09.2009 US
(45) 25.09.2018 366 (43) 25.09.2012 294
(73) MONSANTO TECHNOLOGY LLC (US)
800 North Lindbergh Boulevard, Mail Zone E1NA, St. Louis, MO 63167, United States of America
(72) BRINKER, Ronald, J. (US), BURNS, Wen, C. (US), FENG, Paul, C.C. (US), GUPTA, Anju (US), HOI, Sio-wai (US), MALVEN, Marianne (US), WU, Kunsheng (US)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)
-

(54) **PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP CHỨA SỰ KIỆN CHUYỂN GEN MON 87708 CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÂY ĐẬU TƯƠNG CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ**

(57) Sáng chế đề cập đến ADN tái tổ hợp chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương và tế bào cây, hạt, phần của cây và sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708. Sáng chế cũng đề xuất các polynucleotit đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708 và cây, tế bào cây, hạt, các phần của cây và các sản phẩm hàng hóa chứa polynucleotit đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo ra cây đậu tương chịu thuốc diệt cỏ liên quan đến sự kiện chuyển gen MON 87708.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Sự kiện chuyển gen này thể hiện sự dung nạp với thuốc diệt cỏ dicamba. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến cây, phần của cây, hạt của cây, tế bào cây, các sản phẩm nông nghiệp và phương pháp liên quan đến sự kiện chuyển gen MON 87708 và đề xuất các phân tử nucleotit mà thu được từ sự kiện chuyển gen này liên quan đến việc chèn ADN chuyển gen vào hệ gen của cây đậu tương (*Glycine max*).

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cây đậu tương (*Glycine max*) là cây trồng quan trọng của nhiều vùng trên thế giới, và các phương pháp công nghệ sinh học đã được áp dụng đối với cây trồng này nhằm thu được cây đậu tương có các tính trạng mong muốn. Một tính trạng mong muốn đó là khả năng chịu được thuốc diệt cỏ. Biểu hiện của gen chuyển chịu thuốc diệt cỏ trong cây trồng có thể tạo ra cho cây tính trạng chịu được thuốc diệt cỏ mong muốn, nhưng biểu hiện của gen chuyển có thể bị ảnh hưởng bởi vị trí nhiễm sắc thể và kết quả di truyền của sự chèn gen chuyển. Ví dụ, thường thấy rằng cây thường có sự biến đổi tùy theo mức và mô hình của biểu hiện gen chuyển trong các sự kiện chuyển gen riêng lẻ vốn khác nhau về vị trí chèn trong nhiễm sắc thể của gen chuyển, nhưng đôi khi lại giống nhau. Giữa các sự kiện chuyển gen cũng có thể có sự khác nhau về kiểu hình hoặc đặc tính nông học không mong muốn và/hoặc mong muốn. Do đó, thường cần phải tạo ra và phân tích một lượng lớn các sự kiện chuyển gen biến nạp cây riêng lẻ nhằm chọn được sự kiện chuyển gen có cả tính trạng mong muốn và các đặc tính kiểu hình và nông học tối ưu cần thiết mà phù hợp với các mục đích thương mại. Việc chọn lọc này thường yêu cầu các thử nghiệm trong nhà kính và trên cánh đồng với nhiều sự kiện chuyển gen kéo dài trong nhiều năm, ở nhiều vị trí, và trong các điều kiện khác nhau để có thể thu thập được nhiều dữ liệu về đặc tính nông học, kiểu hình và đặc tính phân tử. Sau đó, dữ liệu và các quan sát thu được này cần được phân tích bởi đội ngũ các nhà khoa học và các nhà nông học nhằm chọn ra sự kiện chuyển gen thích hợp cho mục đích thương mại. Sau khi được chọn, sự kiện chuyển

gen đã nêu này có thể được sử dụng để đưa tính trạng mong muốn vào các cơ sở di truyền của chúng bằng các phương pháp lai giống cây và do đó tạo ra được nhiều giống cây trồng khác nhau chứa các tính trạng mong muốn và được đáp ứng thích hợp với các điều kiện sinh trưởng đặc trưng đối với từng địa phương.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất cây đậu tương chuyển gen được gọi là sự kiện chuyển gen MON 87708, thể hiện khả năng chịu được các ứng dụng thuốc diệt cỏ dicamba có thể chấp nhận được trên thị trường, có hạt tiêu biểu được nộp lưu tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (ATCC) với số truy cập PTA-9670. Sáng chế cũng đề xuất các phân tử ADN mới liên quan sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương và phương pháp sử dụng các phân tử này. Sáng chế cũng đề xuất hạt, thể hệ con lai, phần của cây, tế bào, và các sản phẩm hàng hóa từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sử dụng sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương và phương pháp sản xuất cây đậu tương chịu được dicamba.

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN tái tổ hợp liên quan đến sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Các phân tử ADN tái tổ hợp này có thể chứa các phân tử nucleotit có trình tự nucleotit đại diện vùng ADN hệ gen nằm kẹp sườn đoạn chèn gen chuyển và/hoặc trình tự tiếp giáp của vùng bất kỳ trong các vùng này như vùng tiếp hợp giữa đoạn chèn gen chuyển và ADN hệ gen nằm kẹp sườn của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Ngoài ra, sáng chế đề xuất các phân tử ADN hữu ích để làm các đoạn mồi và các đầu dò chẩn đoán cho sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, và các amplicon chẩn đoán cho sự có mặt của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Sáng chế cũng đề cập đến cây đậu tương, tế bào cây, phần của cây, các sản phẩm hàng hóa, thể hệ con lai và hạt cây đậu tương chứa các phân tử này.

Sáng chế đề xuất phương pháp, chế phẩm và kit hữu ích để phát hiện sự có mặt và/hoặc không có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, và do đó phát hiện sự có mặt và/hoặc không có mặt của sự kiện chuyển gen. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện sự kiện chuyển gen MON 87708 bằng cách cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với bộ đoạn mồi mà khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương để tạo ra ADN đã được khuếch đại nhằm phát hiện sự kiện chuyển

gen MOM 87708 của cây đậu tương, thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, bằng cách đó tạo ra ADN đã được khuếch đại và phát hiện sự có mặt và/hoặc không có mặt của ADN đã được khuếch đại. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phát hiện 87708 bằng cách cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với đầu dò mà khi được sử dụng trong phản ứng lai với ADN từ sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương lai với phân tử ADN đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương, thực hiện phản ứng lai và phát hiện sự lai của đầu dò với phân tử ADN. Sáng chế cũng đề cập bao gồm phương pháp và chế phẩm của sáng chế hữu ích để phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương.

Sáng chế đề xuất cây đậu tương, hạt, tế bào cây, cây thế hệ con lai, phần của cây, hoặc sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ cây, tế bào cây, hoặc hạt của sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương. Sáng chế cũng đề xuất cây đậu tương, hạt, tế bào cây, cây thế hệ con lai, phần của cây, hoặc sản phẩm hàng hóa chứa phân tử ADN tái tổ hợp có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và các phần bổ sung và các đoạn của trình tự này. Sáng chế cũng đề xuất cây đậu tương, hạt, tế bào cây, cây thế hệ con lai, phần của cây hoặc sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ cây hoặc hạt của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương và chứa phân tử ADN tái tổ hợp tạo ra phân tử ADN đã được khuếch đại bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:7 và/hoặc SEQ ID NO:8 trong phương pháp khuếch đại ADN.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng bằng cách trồng cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 và sau đó sử dụng một lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba có khả năng phòng trừ cỏ dại mà không làm tổn thương cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708. Sáng chế cũng đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng bằng cách sử dụng một lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng và sau đó trồng giống MON 87708 của cây đậu tương trên cánh đồng này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt đậu tương về cơ bản không lẫn hạt của các loài cỏ dại độc hại bằng cách gieo hạt của giống đậu tương chịu dicamba MON 87708 trên cánh đồng, sau khi cây mọc, sử dụng một lượng thuốc diệt cỏ dicamba hữu hiệu đủ để tiêu diệt các loài cỏ dại độc hại từ cánh đồng và thu hoạch hạt từ cánh đồng này.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất cây đậu tương và/hoặc hạt cây đậu

trương mà chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba bằng cách lai chéo cây từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:7 và/hoặc SEQ ID NO:8 với cây đậu tương thứ hai, bằng cách đó tạo ra hạt, làm cho hạt mọc mầm để sản xuất cây thế hệ con lai, xử lý cây thế hệ con lai này với dicamba và chọn cây thế hệ con lai chịu được dicamba. Phương pháp này cũng có thể bao gồm việc tự thụ phấn cây thế hệ con lai được chọn để sản xuất nhiều cây lai thế hệ thứ hai và lựa chọn cây chịu được dicamba từ các cây này. Phương pháp theo sáng chế có thể cũng bao gồm bước lai chéo cây thế hệ con lai được chọn với cây đậu tương khác để sản xuất hạt, làm cho hạt mọc mầm để sản xuất cây lai thế hệ thứ hai, xử lý cây lai thế hệ thứ hai với dicamba, và chọn cây lai thế hệ thứ hai chịu được dicamba. Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất cây đậu tương và/hoặc hạt cây đậu tương mà chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba bằng cách tự thụ phấn cây từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:7 và/hoặc SEQ ID NO:8, bằng cách đó sản xuất hạt, làm cho hạt mọc mầm để sản xuất cây thế hệ con lai, xử lý cây thế hệ con lai này với dicamba; và chọn cây thế hệ con lai chịu được dicamba.

Sáng chế đề xuất phương pháp xác định tình trạng tiếp hợp giao tử của cây hoặc hạt từ giống đậu tương MON 87708, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu ADN đậu tương tiếp xúc với bộ đoạn mồi chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, và SEQ ID NO:14 và HCVR có trình tự nêu trong SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:16; sau đó thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic với mẫu; bộ đoạn mồi, và bộ đầu dò; sau đó phát hiện trong phản ứng axit khuếch đại axit nucleic từ tín hiệu huỳnh quang thứ nhất để chẩn đoán cho sự kiện chuyển gen MON 87708 và tín hiệu huỳnh quang thứ hai khác với tín hiệu huỳnh quang thứ nhất để chẩn đoán cho ADN hệ gen đậu tương tự nhiên tương ứng với vị trí đoạn chèn của gen chuyển của sự kiện chuyển gen MON 87708; và phân tích sự có mặt và/hoặc không có mặt của tín hiệu huỳnh quang thứ nhất và tín hiệu huỳnh quang thứ hai trong phản ứng khuếch đại axit nucleic, trong đó nếu có mặt của cả hai tín hiệu cho thấy rằng mẫu là không đồng nhất đối với sự kiện chuyển gen MON 87708 và nếu chỉ có mặt của tín hiệu huỳnh quang thứ nhất cho thấy rằng mẫu là đồng nhất đối với sự kiện chuyển gen MON 87708.

Sáng chế còn đề xuất cây đậu tương, hạt, tế bào cây, hoặc phần của cây chứa vùng haplotype trên nhóm liên kết 9 tại vị trí bản đồ khoảng 143.5 bao gồm gen chịu

được dicamba và được xác định thêm bằng cửa sổ haplotype 19743 và 19767, và phương pháp sử dụng chúng. Các khía cạnh nêu trên và các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn nhờ sự mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa tổ chức của đoạn chèn gen chuyển trong hệ gen của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương; [A] tương ứng với vị trí liên quan của trình tự nêu trong SEQ ID NO:1, bao gồm 100 nucleotit của đoạn tiếp hợp giữa ADN hệ gen đậu tương và phần 5' của ADN đoạn chèn gen chuyển; [B] tương ứng với vị trí liên quan của trình tự nêu trong SEQ ID NO:7, bao gồm 100 nucleotit của đoạn tiếp hợp giữa ADN hệ gen đậu tương và phần 5' của ADN đoạn chèn gen chuyển; [B] tương ứng với vị trí liên quan của trình tự nêu trong SEQ ID NO:2, bao gồm 100 nucleotit của đoạn tiếp hợp giữa ADN hệ gen đậu tương và phần 3' của ADN đoạn chèn gen chuyển; [B] tương ứng với vị trí liên quan trong SEQ ID NO:8, bao gồm 100 nucleotit của đoạn tiếp hợp giữa ADN hệ gen đậu tương và phần 3' của ADN đoạn chèn gen chuyển; [C] tương ứng với vị trí liên quan của trình tự nêu trong SEQ ID NO:3, là trình tự hệ gen đậu tương nằm kẹp sườn đầu 5' được chỉ định/định rõ tùy ý của cấu trúc biểu hiện được tích hợp vào trong hệ gen trong sự kiện chuyển gen MON 87708; [D] tương ứng với vị trí liên quan của trình tự nêu trong SEQ ID NO:4, là trình tự hệ gen đậu tương nằm kẹp sườn đầu 3' được chỉ định/định rõ tùy ý trong cấu trúc biểu hiện được tích hợp vào trong hệ gen trong sự kiện chuyển gen MON 87708; [E] biểu diễn các yếu tố khác nhau chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO:5 và trình tự của cấu trúc biểu hiện được chèn vào hệ gen của sự kiện chuyển gen MON 87708; và [F] biểu diễn các trình tự liên kết (được gọi là SEQ ID NO:6) bao gồm, như được thể hiện trên hình vẽ theo chiều từ trái sang phải, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 và SEQ ID NO:4, trong đó SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:8 bao gồm, như các trình tự này có trong hệ gen trong sự kiện chuyển gen MON 87708.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO:1 là trình tự bao gồm 60 nucleotit đại diện đoạn tiếp hợp 5' giữa ADN hệ gen đậu tương và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp. SEQ ID NO:1 được nằm trong SEQ ID NO:6 tại vị trí nucleotit 1097-1156.

SEQ ID NO: 2 là trình tự bao gồm 60 nucleotit đại diện đoạn tiếp hợp 3' giữa ADN hệ gen đậu tương và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp. SEQ ID NO: 2 được nằm trong SEQ ID NO: 6 tại vị trí nucleotit 4100-4159.

SEQ ID NO: 3 là trình tự 5' nằm kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện chuyển gen MON 87708 lên tới và bao gồm vùng chứa đoạn chèn ADN gen chuyển.

SEQ ID NO: 4 là trình tự 3' nằm kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện chuyển gen MON 87708 lên tới và bao gồm vùng chứa đoạn chèn ADN gen chuyển.

SEQ ID NO: 5 là trình tự của cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 6 là trình tự nucleotit biểu diễn đoạn tiếp giáp của trình tự 5' nằm kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương (SEQ ID NO: 3), trình tự của ADN được chèn (SEQ ID NO: 5) và trình tự 3' nằm kẹp sườn ADN được chèn của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương (SEQ ID NO: 4) và bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 7 là trình tự bao gồm 100 nucleotit đại diện đoạn tiếp hợp 5' giữa ADN hệ gen đậu tương và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 8 là trình tự bao gồm 100 nucleotit đại diện đoạn tiếp hợp 3' giữa ADN hệ gen đậu tương và cấu trúc biểu hiện gen chuyển được tích hợp.

SEQ ID NO: 9 là trình tự của đoạn mồi được gọi là đoạn mồi SQ13570 và được sử dụng để nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Được đánh giá cao đối với cấu trúc biểu hiện được chèn tại vùng gần với mép đoạn chèn gen chuyển 3'. Amplicon PCR được sản xuất từ TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) xét nghiệm sử dụng đồng thời các đoạn mồi SQ13570 và SQ13571 (SEQ ID NO: 10) là kết quả dương tính đối với sự có mặt của sự kiện chuyển gen MON 87708.

SEQ ID NO: 10 là trình tự của đoạn mồi được gọi là đoạn mồi SQ13570 và được sử dụng để nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Đoạn mồi này bổ sung cho vùng 3' nằm kẹp sườn cấu trúc biểu hiện được chèn và gần với mép chèn ADN gen chuyển. Amplicon PCR được sản xuất từ thử nghiệm TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) sử dụng sự kết hợp các đoạn mồi SQ13570 (SEQ ID NO: 9) và SQ13571 là kết quả dương tính cho sự có mặt của sự kiện chuyển gen

MON 87708.

SEQ ID NO: 11 là trình tự của đầu dò được gọi là đầu dò PB4655 và được sử dụng để nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Đầu dò này là bổ sung cho vùng mở rộng đoạn tiếp hợp 3' của cấu trúc biểu hiện được chèn và ADN hệ gen. Đầu dò này là oligonucleotit gắn tín hiệu 6-FAM™. Sự giải phóng của tín hiệu huỳnh quang trong phản ứng khuếch đại khi sử dụng các đoạn mồi SQ13570 và SQ13571 (SEQ ID NO: 9-10) đồng thời với đầu dò PB4655 gắn tín hiệu 6-FAM™ để xác định cho sự kiện chuyển gen MON 87708 trong xét nghiệm TAQMAN®.

SEQ ID NO: 12 là trình tự của đoạn mồi được gọi là đoạn mồi SQ20632 và được sử dụng để nhận biết tình trạng tiếp hợp giao tử đối với sự kiện chuyển gen MON 87708.

SEQ ID NO: 13 là trình tự của đoạn mồi được gọi là đoạn mồi SQ20636 và được sử dụng để nhận biết tình trạng tiếp hợp giao tử ở cây đậu tương kiểu dại và sự kiện chuyển gen MON 87708.

SEQ ID NO: 14 là trình tự của đoạn mồi được gọi là đoạn mồi SQ20637 và được sử dụng để xác định tình trạng tiếp hợp giao tử ở cây đậu tương loại kiểu dại.

SEQ ID NO: 15 là trình tự của đầu dò được gọi là đầu dò PB10130 và được sử dụng để xác định tình trạng tiếp hợp giao tử của sự kiện chuyển gen MON 87708.

SEQ ID NO: 16 là trình tự của đầu dò được gọi là đầu dò PB10131 và được sử dụng để xác định tình trạng tiếp hợp giao tử ở cây đậu tương kiểu dại.

Các định nghĩa và phương pháp sau được cung cấp nhằm xác định sáng chế tốt hơn và hướng dẫn cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện sáng chế. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Sáng chế đề xuất sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương có khả năng chịu được khi sử dụng thuốc diệt cỏ được chấp nhận được trên thị trường. Sự kiện chuyển gen chứa một đoạn chèn ADN chuyển gen vào nhiễm sắc thể/hệ gen của chất mầm nguyên sinh của cây đậu tương. “Sự kiện chuyển gen” được tạo ra bằng cách: (i) biến nạp tế bào cây có cấu trúc axit nucleic bao gồm gen chuyển quan tâm, (ii) tái sinh quần thể cây tạo ra từ việc chèn gen chuyển vào trong hệ gen của cây, và (iii) lựa chọn cây cụ thể được đặc trưng bởi đoạn chèn của gen chuyển vào vị trí đặc trưng trong hệ

gen của cây. Thuật ngữ "sự kiện chuyển gen" chỉ thể biến nạp gốc bao gồm gen chuyển được chèn vào vị trí đặc biệt trong hệ gen của cây. Thuật ngữ "sự kiện chuyển gen" chỉ thể biến nạp gốc bao gồm gen chuyển được chèn vào vị trí đặc biệt trong hệ gen của cây. Thế hệ con lai đó có thể được sản xuất bằng cách lai cùng giống hữu tính giữa thể biến nạp, hoặc thế hệ con lai của nó với cây khác. Cây khác này có thể là cây chuyển gen chứa cùng gen chuyển hoặc chứa gen chuyển khác nhau và/hoặc cây không chuyển gen như cây từ giống khác. Sự kiện chuyển gen sau khi lai ngược được lặp lại với cây bố mẹ, ADN được chèn và ADN kẹp sườn từ bố mẹ được biến đổi gen có mặt trong thế hệ con lai của cây lai ở cùng vị trí trong hệ gen.

Khi được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "cây đậu tương" nghĩa là cây *Oryza sativa* và bao gồm tất cả các giống cây mà có thể được nhân giống được với cây đậu tương, bao gồm các loài cây đậu tương hoang dã cũng như các cây đậu tương thuộc loài *Glycine* mà cho phép lai giữa các loài.

Thuật ngữ "sự kiện chuyển gen" chỉ phân tử ADN từ thể biến nạp gốc chứa ADN được chèn vào ADN hệ gen của cây đậu tương kẹp sườn liền kề với ADN được chèn. Phân tử ADN này được tạo ra bằng cách chèn ADN chuyển gen vào hệ gen của cây đậu tương, nghĩa là, bằng cách biến nạp. Do đó, phân tử ADN này bao gồm trình tự nucleotit mà cả hai đều đặc trưng cho sự kiện chuyển gen và sự kiện chuyển gen đó chỉ liên quan đến hệ gen của cây đậu tương thành hệ gen mà ADN chuyển gen đã được chèn, trong đó trình tự nucleotit này chứa cả trình tự của vùng đặc trưng của ADN hệ gen của cây đậu tương và của đoạn chèn ADN chuyển gen. Do đó, sự sắp xếp của ADN được chèn trong sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương liên quan đến ADN hệ gen đậu tương xung quanh là đặc trưng và chỉ duy nhất cho sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Phân tử ADN này cũng là phần tích hợp của nhiễm sắc thể của đậu tương của sự kiện chuyển gen MON 87708 mà bao gồm sự kiện chuyển gen 87708 và như vậy không bị thay đổi trong cây và có thể di truyền cho thế hệ con lai của cây.

Sự kiện chuyển gen MON 87708 bao gồm gen chuyển mà tạo ra cho cây đậu tương khả năng chịu được thuốc diệt cỏ dicamba. "Dicamba" là axit 3,6-diclo-2-metoxybenzoic. Dicamba là thuốc diệt cỏ auxin tổng hợp hữu ích để phòng trừ cỏ dại lá to. Cây đậu tương được biến nạp với dicamba mono-oxygenaza (DMO), enzym được tách dòng từ *Stenotrophomonas maltophilia* mà thường được tìm thấy trong bầu rễ đất. Dicamba mono-oxygenaza là enzym xúc tác khử hoạt tính của dicamba thông qua phản

ứng khử nhóm methyl tại vị trí O thành hợp chất axit 3,5-diclosalixylic không có tính chất diệt cỏ. Tùy theo từng vùng trên thế giới, các loài cỏ dại độc hại có thể phát triển dẫn đến lấn vào hạt đậu tương được thu hoạch mà có thể ảnh hưởng đến sức khỏe và dinh dưỡng của động vật được cho ăn các sản phẩm hàng hóa từ đậu tương bị tạp nhiễm này. Cỏ dại này có thể được loại bỏ khỏi cánh đồng đậu tương bằng cách xử lý với thuốc diệt cỏ dicamba. Các loài thuộc nhóm cỏ dại độc hại này bao gồm *Cardaria* spp., *Heliotropium* spp., *Centaurea* spp., *Senecio* spp., *Crotalaria* spp., *Solanum* spp., *Xanthium* spp., *Amsinckia* spp., *Cassia* spp., *Sesbania* spp., *Datura* spp., *Ricinus* spp., *Argemone* spp., *Corchorus* spp., *Impomoea* spp. và *Echium* spp.

Theo sáng chế, thuật ngữ "tái tổ hợp" chỉ dạng của ADN và/hoặc protein và/hoặc sinh vật mà thường không tìm thấy được trong tự nhiên và chẳng hạn, được tạo ra bởi sự can thiệp của con người. Sự can thiệp của con người có thể tạo ra phân tử ADN tái tổ hợp và/hoặc cây tái tổ hợp. Theo sáng chế, "phân tử ADN tái tổ hợp" là phân tử ADN bao gồm sự kết hợp của các phân tử ADN mà thường không có mặt đồng thời mà là kết quả của sự can thiệp của con người, ví dụ, phân tử ADN mà bao gồm sự kết hợp của ít nhất hai phân tử ADN khác loài với nhau, và/hoặc phân tử ADN được tổng hợp nhân tạo và bao gồm trình tự polynucleotit có nguồn gốc từ trình tự polynucleotit thường có trong tự nhiên, và/hoặc phân tử ADN chứa gen chuyển được sáp nhập theo cách nhân tạo vào ADN hệ gen của tế bào chủ và ADN kẹp sườn được kết hợp vào hệ gen của tế bào chủ. Ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN được mô tả trong sáng chế được tạo ra bằng cách chèn gen chuyển vào ADN hệ gen của cây đậu tương, mà cuối cùng tạo ra biểu hiện của ARN và/hoặc phân tử protein tái tổ hợp trong sinh vật đó. Theo sáng chế, "cây tái tổ hợp" là cây mà thường không có trong tự nhiên, mà là kết quả của sự can thiệp của con người, và chứa gen chuyển và/hoặc phân tử ADN khác loài được sáp nhập vào trong hệ gen của nó. Kết quả của sự biến đổi bởi con người này là cây tái tổ hợp khác biệt một cách rõ rệt với cây kiểu dại tương ứng. Ví dụ về cây tái tổ hợp là cây đậu tương được mô tả theo sáng chế là sự kiện chuyển gen MON 87708.

Khi được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ "gen chuyển" chỉ phân tử nucleotit được hợp nhất nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ. Gen chuyển đó có thể khác loại với tế bào chủ. Thuật ngữ "cây chuyển gen" chỉ cây chứa gen chuyển đó.

Theo sáng chế, thuật ngữ "khác loại" chỉ phân tử thứ nhất thường không kết hợp với phân tử thứ hai trong tự nhiên. Ví dụ, phân tử có thể có nguồn gốc từ loài thứ nhất

và được chèn vào trong hệ gen của loài thứ hai. Do đó phân tử này sẽ khác loại với vật chủ và được hợp nhất nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ.

Theo sáng chế, thuật ngữ “khảm” chỉ phân tử ADN đơn được sản xuất bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó phân tử ADN thứ nhất hoặc phân tử ADN thứ hai thường không có trong cấu hình đó, nghĩa là, được dung hợp với nhau. Do đó, phân tử ADN khảm là phân tử ADN mới và thường không có trong tự nhiên.

Sáng chế đề xuất phân tử ADN và các trình tự nucleotit tương ứng của phân tử này. Theo sáng chế, thuật ngữ “ADN”, “phân tử ADN”, “phân tử polynucleotit” chỉ phân tử ADN của hệ gen hoặc có nguồn gốc tổng hợp, nghĩa là, polyme của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc của phân tử polynucleotit, theo chiều đầu 5’ (hướng ngược) đến đầu 3’ (hướng xuôi). Theo sáng chế, thuật ngữ “trình tự ADN”, “trình tự nucleotit” hoặc “trình tự polynucleotit” chỉ trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp được sử dụng trong sáng chế là danh pháp được quy định bởi Điều 37 của bộ Luật Hoa Kỳ về các quy định Liên bang § 1.822 và được nêu ra trong các bảng trong tiêu chuẩn WIPO ST.25 (1998), Phụ lục 2, các bảng 1 và 3. Theo sáng chế, các trình tự nucleotit theo sáng chế được cung cấp là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8 và các đoạn của các trình tự này được bộc lộ chỉ tham chiếu đến một trong số hai chuỗi trình tự nucleotit bổ sung. Bằng cách ngụ ý, các trình tự bổ sung (nghĩa là, các trình tự của sợi bổ sung), trong kỹ thuật còn được gọi là các trình tự bổ sung ngược, thuộc trong phạm vi của sáng chế và thuộc đối tượng được bảo hộ.

Trình tự nucleotit tương ứng với trình tự nucleotit bổ sung của ADN chuyển gen được chèn và các đoạn cơ bản của ADN hệ gen của cây đậu tương nằm kẹp sườn đầu của ADN chuyển gen được chèn được đề xuất theo sáng chế như trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 6. Phần phụ của trình tự này là ADN chuyển gen được chèn được cung cấp như trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5. Trình tự nucleotit của ADN hệ gen của cây đậu tương được liên kết vật lý bởi cầu nối liên kết phosphodiester và do đó nằm ở kẹp sườn đầu 5' của ADN chuyển gen được nêu như được mô tả trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3. Trình tự nucleotit của ADN hệ gen của cây đậu tương được liên kết vật lý bởi cầu nối liên kết phosphodiester với và do đó nằm ở kẹp sườn đầu 3' của ADN chuyển gen được nêu như được trình bày trong SEQ ID NO: 4.

Sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương bao gồm thêm hai vùng, một vùng mở rộng vị trí 5' và một vùng mở rộng vị trí 3', trong đó ADN chuyển gen được chèn vào ADN hệ gen, theo sáng chế các đoạn này được gọi là các đoạn tiếp hợp 5' và 3'. "Trình tự tiếp hợp" hay "vùng tiếp hợp" chỉ trình tự ADN và/hoặc phân tử ADN tương ứng mà kéo dài qua cả ADN chuyển gen được chèn và ADN hệ gen kẹp sườn kế cận. Các trình tự tiếp hợp tùy ý được mô tả bởi hai trình tự bao gồm 60 nucleotit và được cung cấp là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, mỗi trình tự này bao gồm 30 nucleotit của ADN hệ gen kẹp sườn liền kề tiếp giáp với 30 nucleotit của ADN được chèn. Các trình tự tiếp hợp tùy ý được biểu diễn bởi hai trình tự gồm 100 nucleotit và được cung cấp là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8, mỗi trình tự biểu diễn 50 nucleotit của ADN hệ gen kẹp sườn liền kề được tiếp giáp với 50 nucleotit của ADN chèn. Các nucleotit này được nối bằng liên kết phosphodiester và sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương là có mặt là một phần trong hệ gen. Trong cây đậu tương, sự nhận biết một hoặc nhiều trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, và SEQ ID NO: 8 trong mẫu có nguồn gốc từ cây đậu tương, hạt hoặc phần của cây đậu tương xác định rằng ADN thu được từ sự kiện chuyển gen MON 87708 và phát hiện cho sự có mặt của ADN trong mẫu từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Do đó, sáng chế đề xuất phân tử ADN chứa ít nhất một trình tự nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, và/hoặc SEQ ID NO: 8. Phân đoạn bất kỳ của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen đậu tương 87708 đầy đủ chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, và/hoặc SEQ ID NO: 8 đều thuộc phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, polynucleotit bất kỳ chứa trình tự bổ sung cho trình tự bất kỳ được mô tả này đều thuộc phạm vi của sáng chế. Fig. 1 minh họa sự sắp xếp vật lý của trình tự SEQ ID NO: 1 đến 5 và 7 đến 8 liên quan đến SEQ ID NO: 6 được sắp xếp theo chiều từ đầu 5' đến đầu 3'.

Sáng chế đề xuất các phân tử ADN, ví dụ mà có thể được sử dụng như các đoạn môi hoặc đầu dò để chẩn đoán sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 trong mẫu. Các đoạn môi hoặc đầu dò này là đặc hiệu đối với trình tự axit nucleic đích và như vậy hữu ích cho việc nhận biết sự kiện chuyển gen đậu tương 87708 bằng các phương pháp của sáng chế được mô tả trong bản mô tả.

"Đoạn môi" thường là polynucleic có độ tinh sạch cao được phân lập mà được thiết kế để sử dụng trong các phương pháp ủ hoặc lai đặc trưng liên quan đến phản ứng khuếch

đại nhiệt. Cặp đoạn mồi có thể được sử dụng với ADN khuôn, chẳng hạn, mẫu của ADN hệ gen của cây đậu tương, trong phản ứng khuếch đại nhiệt, chẳng hạn, phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), để tạo ra amplicon, trong đó amplicon được tạo ra từ phản ứng đó sẽ có trình tự ADN tương ứng với trình tự của ADN khuôn được đặt giữa hai vị trí tại đó các đoạn mồi được lai với khuôn. Theo sáng chế, "amplicon" là phần hoặc đoạn của ADN mà đã được tổng hợp sử dụng kỹ thuật khuếch đại. Amplicon theo sáng chế bao gồm ít nhất một trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, và/hoặc SEQ ID NO: 8. Đoạn mồi thường được thiết kế để lai với sợi ADN đích bổ sung để tạo ra đoạn lai giữa đoạn mồi và sợi ADN đích, và sự có mặt của đoạn mồi là điểm nhận biết bởi polymeraza để kéo dài của đoạn mồi đó (nghĩa là, sự trùng hợp của các nucleotit bổ sung thành phân tử nucleotit dài) sử dụng sợi khuôn ADN đích. Cặp đoạn mồi, theo sáng chế, chỉ việc sử dụng hai đoạn mồi liên kết với các sợi đối diện của đoạn nucleotit được xoắn kép nhằm khuếch đại tuyến tính đoạn polynucleotit giữa các vị trí đích để liên kết bởi các thành phần riêng biệt của cặp đoạn mồi, thường trong phản ứng khuếch đại hoặc trong các phương pháp khuếch đại axit nucleic thông thường khác. Các phân tử ADN đối chứng hữu ích để làm đoạn mồi được cung cấp như các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9-10. Cặp đoạn mồi được cung cấp là các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10, hữu ích đóng vai trò là phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai mà khác với phân tử ADN thứ nhất, và cả hai phân tử, mỗi phân tử có chiều dài vừa đủ gồm các nucleotit liên tiếp có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, hoặc SEQ ID NO: 6 có chức năng là các đoạn mồi ADN mà, khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại nhiệt với ADN khuôn có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, tạo ra amplicon chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 2.

"Đầu dò" là axit nucleic được phân lập mà bổ sung với sợi axit nucleic đích. Các đầu dò theo sáng chế không chỉ bao gồm axit deoxyribonucleic hoặc axit ribonucleic mà còn bao gồm các polyamit và các vật chất đầu dò khác mà liên kết một cách đặc hiệu với trình tự ADN đích và việc phát hiện sự liên kết này có thể hữu ích để chẩn đoán, phân biệt và xác định, hoặc xác nhận biết sự có mặt của trình tự ADN đích trong mẫu cụ thể. Đầu dò có thể được gắn với nhãn có thể phát hiện được thông thường hoặc phân tử chỉ thị, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ, phối tử, chất phát quang hóa học, hoặc enzym.

Các phân tử ADN ví dụ hữu ích làm đoạn mồi được cung cấp là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11.

Các đầu dò và đoạn mồi theo sáng chế có thể có trình tự bổ sung giống với trình tự đích, mặc dù các đoạn mồi và các đầu dò khác với trình tự đích mà có khả năng lai ưu tiên với các trình tự đích có thể được thiết kế bằng các phương pháp thông thường. Để cho phân tử axit nucleic đáp ứng như đoạn mồi hoặc đầu dò, nó chỉ bổ sung vừa đủ trong trình tự có khả năng tạo thành cấu trúc sợi kép dưới dung môi và các nồng độ muối cụ thể được sử dụng. Phương pháp lai hoặc khuếch đại axit nucleic bất kỳ thường được sử dụng đều có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt của ADN chuyển gen từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu. Các đầu dò và các đoạn mồi thường chứa ít nhất khoảng 11 nucleotit, ít nhất khoảng 18 nucleotit, ít nhất khoảng 24 nucleotit, hoặc ít nhất khoảng 30 nucleotit hoặc có dài hơn. Các đầu dò và đoạn mồi đó lai một cách đặc hiệu với trình tự ADN đích trong điều kiện lai nghiêm ngặt. Điều kiện nghiêm ngặt thường được mô tả bởi Sambrook và cộng sự, 1989, và bởi Haymes và cộng sự, trong: *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, thông tấn xã IRL, Washington, DC (1985). Khi được sử dụng theo sáng chế, hai phân tử axit nucleic đã nêu có khả năng lai một cách đặc hiệu với nhau nếu chúng phân tử có khả năng tạo thành cấu trúc axit nucleic sợi kép, đối song song. Phân tử axit nucleic là "trình tự bổ sung" của phân tử axit nucleic khác nếu chúng thể hiện tính bổ sung đầy đủ. Khi được sử dụng theo sáng chế, các phân tử thể hiện "tính bổ sung đầy đủ" khi phân tử nucleotit này bổ sung cho phân tử nucleotit khác. Hai phân tử được nói có "tính bổ sung tối thiểu" nếu chúng có thể lai với nhau với sự ổn định vừa đủ sao cho chúng duy trì được sự dung hợp ổn định vừa đủ trong ít nhất là các điều kiện "nghiêm ngặt thấp" thông thường. Tương tự, hai phân tử là "bổ sung" nếu chúng có thể lai với nhau sao cho chúng duy trì được sự ổn định vừa đủ trong điều kiện "nghiêm ngặt cao" thông thường. Các sai lệch với tính bổ sung đầy đủ do đó có thể được cho phép, miễn là các sai lệch đó không làm mất khả năng tạo thành cấu trúc sợi kép của các phân tử.

Theo sáng chế, thuật ngữ "phân lập được" chỉ ít nhất là việc tách một phân tử ra khỏi các phân tử khác thường kết hợp với nó trong trạng thái tự nhiên hay ban đầu của nó. Trong một phương án, thuật ngữ "được phân lập" chỉ phân tử ADN mà ít nhất là được tách ra từ một phần các axit nucleic mà thường nằm bên sườn phân tử ADN trong trạng thái tự nhiên hay trạng thái ban đầu của nó. Do đó, các phân tử ADN được

kết hợp với nhau thành các trình tự điều chỉnh hoặc mã hóa với thành phần mà thường chúng không kết hợp, ví dụ, là kết quả của kỹ thuật tái tổ hợp, được xem là được phân lập theo sáng chế. Các phân tử đó được xem là phân lập được ngay cả khi nó được tích hợp vào trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ hoặc có mặt trong dung dịch axit nucleic với các phân tử ADN khác.

Số lượng phương pháp bất kỳ đã được nhiều người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết đến có thể được sử dụng để phân lập và thao tác phân tử ADN, hoặc đoạn của nó, được bộc lộ theo sáng chế. Ví dụ, kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi polymeraza) có thể được sử dụng để khuếch đại phân tử ADN ban đầu đặc trưng và/hoặc để sản xuất các biến thể của phân tử gốc. Các phân tử ADN, hoặc đoạn của nó, cũng có thể thu được bằng các kỹ thuật khác chẳng hạn như bằng cách tổng hợp trực tiếp đoạn bằng phương pháp hóa học, như được thực hiện thông thường bằng cách sử dụng thiết bị tổng hợp oligonucleotit tự động.

Do đó, các phân tử ADN và các trình tự nucleotit tương ứng được đề cập theo sáng chế là hữu ích để, trong số những lợi ích khác, nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, chọn các giống cây hoặc các cây lai chứa sự kiện chuyển gen MON 87708, phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu, và kiểm tra sự có mặt và/hoặc không có mặt của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương hoặc cây và phần của cây chứa sự kiện chuyển gen MON 17053 của cây đậu tương trong mẫu.

Sáng chế đề xuất cây đậu tương, thể hệ con lai, hạt, tế bào cây, phần của cây (chẳng hạn, phần hoa, noãn, quả, mô hoa, mô rễ, mô thân và mô lá), và các sản phẩm hàng hóa. Cây, thể hệ con lai, hạt, tế bào cây, phần của cây, và các sản phẩm hàng hóa chứa lượng có thể phát hiện được của polynucleotit theo sáng chế, nghĩa là, chẳng hạn như polynucleotit chứa ít nhất một trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 1-8. Các cây, thể hệ con lai, hạt, tế bào cây, phần của cây theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều gen chuyển bổ sung. Gen chuyển này có thể là trình tự nucleotit bất kỳ mã hóa protein hoặc phân tử ARN mà tạo cho tính trạng mong muốn, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng kháng sâu bọ tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, hiệu suất tăng, khả năng chống hạn hán tăng, chất lượng hạt tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện, và/hoặc khả năng chịu thuốc diệt cỏ tăng, so với trình trạng mong muốn của cây đậu tương thiếu gen chuyển bổ sung đó.

Sáng chế đề xuất cây đậu tương, thế hệ con lai, hạt, tế bào cây, phần của cây chẳng hạn phần hoa, nõn, quả, hoa, rễ hoặc mô của thân và lá có nguồn gốc từ cây đậu tương chuyển gen chứa sự kiện chuyển gen MON 87708. Mẫu tiêu biểu của hạt chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 đã được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest cho mục đích cho phép sáng chế. Cơ sở được chọn để nộp lưu là Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Hoa Kỳ (ATCC) có địa chỉ tại 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia USA, Zip Code 20110. Nguồn ATCC đã được ấn định số truy cập PTA-9670 đối với hạt chứa sự kiện chuyển gen MON 87708.

Sáng chế đề xuất vi sinh vật chứa phân tử ADN chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 có mặt trong hệ gen. Ví dụ về vi sinh vật này là tế bào cây chuyển gen. Các vi sinh vật, chẳng hạn như tế bào cây theo sáng chế, là hữu ích trong nhiều ứng dụng công nghiệp, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: (i) sử dụng như công cụ nghiên cứu cho khảo cứu khoa học hoặc nghiên cứu công nghiệp; (ii) sử dụng trong canh trường để sản xuất các sản phẩm carbohydrat, lipid, axit nucleic, hoặc protein ngoại sinh hoặc tái tổ hợp hoặc các phân tử nhỏ mà có thể được sử dụng để nghiên cứu khoa học hoặc các sản phẩm công nghiệp tiếp theo; và (iii) sử dụng với kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật hiện đại để sản xuất cây hoặc các canh trường nuôi cấy mô cây chuyển gen mà sau đó có thể được sử dụng cho nghiên cứu hoặc sản xuất nông nghiệp. Sản xuất và sử dụng các vi sinh vật chẳng hạn như tế bào cây chuyển gen sử dụng kỹ thuật vi sinh hiện đại và sự can thiệp của con người để sản xuất vi sinh vật đơn nhất, được tạo ra bởi con người. Trong quy trình này, ADN tái tổ hợp được chèn vào trong hệ gen của tế bào cây để tạo ra tế bào cây chuyển gen riêng biệt và đơn nhất từ các tế bào cây xuất hiện tự nhiên. Tế bào cây chuyển gen này sau đó có thể được nuôi cấy như các tế bào vi khuẩn và nấm men bằng cách sử dụng các kỹ thuật vi sinh hiện đại và có thể tồn tại ở trạng thái đơn bào không biệt hóa. Chế phẩm và kiểu hình gen của tế bào là tác dụng kỹ thuật được tạo ra bởi sự tích hợp của ADN khác loài vào trong hệ gen của tế bào. Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp sử dụng vi sinh vật theo sáng chế. Phương pháp sử dụng các vi sinh vật theo sáng chế, chẳng hạn như tế bào cây chuyển gen, bao gồm (i) phương pháp sản xuất tế bào chuyển gen bằng cách tích hợp ADN tái tổ hợp vào trong hệ gen của tế bào và sau đó sử dụng tế bào này để tạo ra các tế bào bổ sung chứa ADN khác loài; (ii) phương pháp nuôi cấy tế bào chứa ADN tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật vi sinh hiện đại; (iii) phương pháp sản xuất và tinh chế các sản phẩm

carbonhydrat, lipit, axit nucleic, hoặc protein từ các tế bào được nuôi cấy; và (iv) phương pháp sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô hiện đại với tế bào cây chuyển gen để sản xuất cây chuyển gen hoặc các canh trường nuôi cấy mô của cây chuyển gen.

Cây theo sáng chế có thể truyền sự kiện chuyển gen ADN, bao gồm gen chuyển, cho thế hệ con lai. Theo sáng chế, "thế hệ con lai" bao gồm cây, hạt, tế bào cây, và/hoặc phần của cây bất kỳ có thể tái sinh mà chứa sự kiện chuyển gen ADN có nguồn gốc từ cây và/hoặc polynucleotit ban đầu có ít nhất một trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1 và SEQ ID NO: 2. Cây, thế hệ con lai, và hạt có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử với gen chuyển. Thế hệ con lai này có thể được sinh trưởng từ hạt được tạo ra bởi sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương và/hoặc từ các hạt được tạo ra bởi cây được sinh sản với phần hoa từ cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708.

Cây thế hệ con lai có thể tự thụ phấn (còn gọi là tự sinh sản) để tạo ra dòng gây giống đúng của cây, nghĩa là, cây đồng hợp tử đối với gen chuyển. Sự tự thụ phấn của thế hệ con lai thích hợp có thể sản xuất cây đồng hợp tử đối với cả hai gen ngoại sinh được thêm vào.

Ngoài ra, cây thế hệ con lai có thể được lai khác giống, nghĩa là, lai giống với cây không liên quan khác, để sản xuất hạt hoặc hạt lai, hoặc cây giống hoặc cây lai. Cây không cùng họ khác này có thể là cây chuyển gen hoặc cây không chuyển gen. Do đó, hạt hoặc hạt lai, hoặc cây giống hoặc cây lai trong sáng chế có thể tạo ra bằng cách lai giống bố mẹ thứ nhất thiếu ADN đặc trưng và đơn nhất của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương với cây bố mẹ thứ hai chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, tạo ra cây lai chứa ADN đặc trưng và đơn nhất của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Mỗi bố mẹ có thể là một cây lai hoặc dòng lai cùng dòng/giống, miễn là sự lai giống hoặc gây giống này tạo ra cây hoặc hạt theo sáng chế, nghĩa là, hạt có ít nhất một alen chứa ADN đặc trưng và đơn nhất của sự kiện chuyển gen MON 87708 và/hoặc có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Do đó, hai cây chuyển gen khác nhau có thể được giao phấn để tạo ra cây lai chứa hai gen ngoại sinh được bổ sung, riêng biệt một cách độc lập. Ví dụ, MON 87708 chịu dicamba có thể được lai với cây đậu tương chuyển gen để tạo ra cây có các đặc tính của cả hai bố mẹ chuyển gen. Một ví dụ về sự lai này có thể là sự lai giữa đậu tương chịu được dicamba-MON 87708 với cây có một hoặc nhiều tính trạng bổ sung như chịu được thuốc diệt cỏ (ví dụ, sự kiện chuyển gen 40-3-2 của cây đậu tương hoặc sự kiện chuyển gen

MON89788 của cây đậu tương (US 20060282915)), phòng trừ sâu bọ (ví dụ, sự kiện chuyển gen MON87701 của cây đậu tương (US 20090130071)), và/hoặc các tính trạng mong muốn khác (ví dụ, chế phẩm dầu tăng cường như sự kiện chuyển gen MON87769 của cây đậu tương (WO2009102873)), tạo ra cây hoặc hạt thể hệ con lai mà chịu được dicamba và có một hoặc nhiều tính trạng bổ sung. Thuốc diệt cỏ mà khả năng chịu của cây chuyển gen đã được chứng minh và phương pháp của sáng chế có thể được áp dụng, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: dicamba, glufosinat, sulfonyleure, imidazolinon, bromoxynil, delapon, xyclohexandion, các chất ức chế protoporphyrionogen oxidaza và các thuốc diệt cỏ isoxasflutol. Các phân tử nucleotit mã hóa protein có liên quan đến khả năng chịu được thuốc diệt cỏ đã biết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phân tử nucleotit mã hóa: 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthaza (EPSPS) chịu dicamba (ví dụ, xem: US 5,627,061; US 5,633,435; US 6,040,497; US 5,094,945; US 5,804,425; US 6,248,876; US 7,183,110; RE39,247); dicamba oxidoreductaza (GOX) (xem, ví dụ, US 5,776,760); dicamba-n-axetyltransferaza (GAT); axetolactat synthaza chịu thuốc diệt cỏ (ALS, còn được biết đến là axetohydroxyaxit synthaza (AHAS)) cho khả năng chịu được đối với sulfonyleure, imidazolinon, triazolopyrimidin, pyrimidinyl oxybenzoat, sulfonilamino carbonyl triazolinon, và/hoặc heteroaryl ete; axetyl coenzym A carboxylaza (ACCaza) hoặc R-2,4-diclophenoxypropionat dioxygenaza (rdpA) chịu thuốc diệt cỏ cho khả năng chịu đối với aryloxyphenoxypropionat (AOPP) (chẳng hạn: haloxyfop, quizalofop, diclofop và diclofop); protein khử độc như 2,4-D dioxygenaza (tfdA), R-2,4-diclophenoxypropionat dioxygenaza (rdpA), AryloxyAlkanoat Dioxygenaza (AAD), và/hoặc S-2,4-dichloroprop dioxygenaza (sdpA) cho khả năng chịu được đối với các thuốc diệt cỏ auxin tổng hợp; bromoxynil nitrilaza (Bxn) cho khả năng chịu được Bromoxynil (xem, ví dụ: US 4,810,648); phytoen desaturaza (crtI) cho khả năng chịu được norflurazon; sự kháng bialaphos (bar) hoặc protein phosphinothrixin axetyltransferaza (PAT) (xem, ví dụ, US 5,646,024 và US 5,276,268) về khả năng chịu được glufosinat và bialaphos; và protein cho khả năng chịu được thuốc diệt cỏ triketon (mezotrion, tembotrion, topromezon, isoxazol) như chịu 4-HydroxyPhenylPyruvat Dioxygenaza (HPPD), sắc tố tế bào khử độc P450, hoặc chu trình HPPD như *Arthrobacter globiformis* HPP oxidaza (HPPO) và *Pseudomonas acidovorans* 4-HPA 1-hydroxylaza (HPAH) và NADH oxidoreductaza (HPAC).

Phép lai ngược đối với cây bố mẹ và lai cùng giống với cây không chuyển gen cũng được dự kiến, như sự nhân giống sinh dưỡng. Các mô tả về phương pháp gây giống khác mà thường được sử dụng cho các tính trạng và các cây trồng khác nhau có thể được tìm thấy trong một trong các tài liệu tham khảo, ví dụ, Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Sáng chế đề xuất phần của cây có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Theo sáng chế, "phần của cây" chỉ phần bất kỳ của cây chứa vật liệu có nguồn gốc từ cây đậu tương của sự kiện chuyển gen MON 87708. Phần của cây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phần hoa, noãn, quả, hoa, rễ hoặc mô của thân, sợi, và lá. Phần của cây có thể phát triển và tồn tại độc lập, không phát triển và tồn tại độc lập, có thể tái sinh và/hoặc không thể tái sinh.

Sáng chế đề xuất sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Theo sáng chế, "sản phẩm hàng hóa" chỉ chế phẩm hoặc sản phẩm bất kỳ chứa vật liệu có nguồn gốc từ cây, hạt, tế bào cây, hoặc phần của cây đậu tương từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Các sản phẩm hàng hóa có thể được bán cho người tiêu dùng và có thể tồn tại và phát triển độc lập hoặc không. Các sản phẩm hàng hóa không thể tồn tại và phát triển độc lập bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt và hạt không thể tồn tại và phát triển độc lập, hạt đã được chế biến, mô của cây đông lạnh, và mô của cây đã được chế biến; hạt và phần của cây đã được chế biến cho thức ăn động vật cho tiêu thụ động vật trên cạn và/hoặc động vật thủy sinh, dầu, bột xay thô, bột, gạo ép, cám, sợi, sữa, phó mát, giấy, kem, rượu vang, và thực phẩm bất kỳ khác để con người sử dụng; và sinh khối và các sản phẩm nhiên liệu. Các sản phẩm hàng hóa có thể sống được bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt và tế bào cây. Do đó, sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương có thể được sử dụng để sản xuất sản phẩm hàng hóa bất kỳ thiết yếu từ đậu tương. Sản phẩm hàng hóa bất kỳ này có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương có thể chứa ít nhất lượng có thể phát hiện được của ADN đặc trưng và đơn nhất tương ứng với sự kiện chuyển gen MON 87708, và đặc biệt là có thể chứa lượng có thể phát hiện được của polynucleotit chứa ít nhất 15 nucleotit liền kề trong trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. Bất kỳ phương pháp phát hiện chuẩn đối với các phân tử nucleotit có thể được sử dụng, bao gồm các phương pháp phát hiện được bộc lộ trong bản mô tả.

Sản phẩm hàng hóa thuộc phạm vi của sáng chế nếu trong đó chứa lượng bất kỳ có thể phát hiện được của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

Do đó, cây, thể hệ con lai, hạt, tế bào cây, phần của cây (chẳng hạn như phần hoa, noãn, quả, hoa, rễ hoặc mô của thân và lá), và các sản phẩm hàng hóa của sáng chế là hữu ích để, trong số các lợi ích khác, sinh trưởng của cây nhằm sản xuất hạt và/hoặc phần của cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 cho các mục đích nông nghiệp, sản xuất thể hệ con lai chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 để nhân giống cây và các mục đích nghiên cứu, sử dụng với các kỹ thuật vi sinh cho các ứng dụng công nghiệp và nghiên cứu và bán cho người tiêu dùng.

Sáng chế đề xuất phương pháp phòng trừ cỏ dại và phương pháp sản xuất cây chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba và sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng được đề xuất và bao gồm các bước: trồng cây giống hoặc cây lai từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trên cánh đồng và ứng dụng liều thuốc diệt cỏ dicamba hữu hiệu vào cánh đồng cho mục đích phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng mà không làm tổn hại đến cây MON 87708. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba này có thể thực hiện trước khi cỏ mọc, nghĩa là, tại thời điểm bất kỳ sau khi hạt MON 87708 được gieo và trước khi cây MON 87708 mọc, hoặc sau khi mọc, nghĩa là, tại thời điểm bất kỳ sau khi cây MON 87708 mọc. Phương pháp khác để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng cũng được đề xuất và bao gồm: việc sử dụng một lượng thuốc diệt cỏ dicamba hữu hiệu để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng và sau đó trồng cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trên cánh đồng. Việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba đã nêu là được thực hiện trước khi trồng cây, nghĩa là trước khi hạt MON 87708 được gieo, và có thể được thực hiện tại thời điểm bất kỳ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khoảng 14 ngày trước khi trồng đến khoảng 1 ngày trước khi trồng. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất hạt đậu tương hầu như không lẫn hạt của các loài cỏ dại độc hại bằng cách gieo hạt của giống đậu tương chịu dicamba MON 87708 trên cánh đồng, sử dụng một lượng thuốc diệt cỏ dicamba hữu hiệu sau khi cây mọc sao cho đủ để tiêu diệt các loài cỏ dại độc hại trên cánh đồng, và thu hoạch hạt từ cánh đồng này. Lượng dicamba hữu hiệu có tác dụng diệt cỏ được sử dụng trên cánh đồng bao gồm một lượng nằm trong khoảng từ 0,0057 kg dicamba trên hecta đến 9,08 kg dicamba trên hecta tùy theo vùng và mùa sinh trưởng. Có thể sử dụng nhiều lần dicamba trong một mùa sinh trưởng, ví dụ, hai lần (chẳng hạn, sử dụng trước

khi trồng và sử dụng sau khi mọc hoặc sử dụng trước khi mọc và sử dụng sau khi mọc) hoặc ba lần sử dụng (chẳng hạn như sử dụng trước khi trồng, sử dụng trước khi mọc và sử dụng sau khi mọc).

Phương pháp sản xuất cây đậu tương chịu thuốc diệt cỏ chứa các trình tự ADN đặc trưng và đơn nhất đối với sự kiện chuyển gen MON 87708 theo sáng chế được đề xuất. Cây chuyển gen được sử dụng trong các phương pháp này có thể là dạng đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với gen chuyển. Cây thế hệ con lai được sản xuất bằng các phương pháp này có thể là cây giống hoặc cây lai, có thể được sinh trưởng từ hạt được tạo ra bởi cây và/hoặc hạt từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương được tạo ra bằng cách thụ phấn với phấn hoa từ cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708; và có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử đối với gen chuyển. Tiếp đó, cây thế hệ con lai có thể được tự thụ phấn để tạo ra dòng gây giống thực sự của cây, nghĩa là, cây đồng hợp tử đối với gen chuyển, hoặc nếu không có thể được thụ phấn cùng giống, ví dụ, được lai với cây không cùng họ khác, để tạo ra giống tốt hoặc hạt hoặc cây lai.

Cây lúa chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba có thể được sản xuất bằng cách lai chéo giữa cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 bao gồm phân tử nucleotit bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 với cây đậu tương khác và bằng cách đó tạo ra hạt, hạt này sau đó được sinh trưởng thành cây thế hệ con lai. Cây thế hệ con lai này sau đó có thể được xử lý bằng thuốc diệt cỏ dicamba để chọn ra cây thế hệ con lai chịu được thuốc diệt cỏ dicamba. Ngoài ra, cây thế hệ con lai này có thể được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp chẩn đoán để chọn ra cây thế hệ con lai chứa ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708. Cây khác được sử dụng trong giao phấn có thể chịu hoặc không chịu được thuốc diệt cỏ dicamba và có thể hoặc không thể chuyển gen. Cây và/hoặc hạt thế hệ con lai được sản xuất có thể là giống tốt hoặc hạt lai. Trong thực tế, bước lai giống hữu tính giữa hai cây, nghĩa là, thụ phấn chéo, có thể được thực hiện hoặc dễ dàng thực hiện bởi con người, ví dụ, bằng cách thu thập phấn của cây này và tiếp xúc phấn này với vòi nhụy hoặc núm nhụy của cây thứ hai; thao tác bởi con người và/hoặc các hoạt động loại bỏ, tiêu diệt, hoặc bọc nhụy hoa hoặc bao phấn của cây (ví dụ, bằng cách bẻ cờ hoặc bằng cách sử dụng hóa chất diệt giao tử) sao cho ngăn cản sự tự thụ phấn tự nhiên xảy ra và bắt buộc sự thụ phấn chéo xảy ra nhằm để tạo ra thế hệ con; bởi côn trùng thay thế con người thụ phấn ở vị trí để xảy ra "sự thụ phấn trực tiếp" (ví dụ, bằng cách đưa các tổ ong vào trong vườn cây ăn quả hoặc trên

cánh đồng hoặc bằng cách nhốt côn trùng thụ phấn với cây); bằng cách mở hoặc cắt bỏ bởi con người đối với các bộ phận của hoa để cho phép thay thế hoặc tiếp xúc phấn hoa từ bên ngoài với vòi nhụy hoặc núm nhụy (ví dụ, ở cây đậu tương mà tự nhiên có hoa làm cản trở hoặc ngăn cản sự thụ phấn chéo, khiến chúng bắt buộc phải thụ phấn một cách tự nhiên mà không cần có sự can thiệp của con người); bằng cách thay thế có chọn lọc các cây (ví dụ, trồng cây một cách có chủ ý ở khoảng cách thụ phấn gần); và/hoặc bằng cách sử dụng hóa chất để thúc đẩy sự nở hoa hoặc để thúc đẩy khả năng tiếp nhận (của núm nhụy đối với phấn hoa).

Cây lúa chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba có thể được tạo ra bởi sự tự thụ phấn cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 chứa phân tử nucleotit bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và bằng cách đó tạo ra hạt, hạt này sau đó được sinh trưởng thành cây thế hệ con lai. Sau đó, cây thế hệ con lai này có thể được xử lý bằng thuốc diệt cỏ dicamba để chọn lọc các cây thế hệ con lai chịu được thuốc diệt cỏ dicamba. Ngoài ra, cây thế hệ con lai này có thể được phân tích bằng cách sử dụng các phương pháp chẩn đoán để chọn các cây thế hệ con lai chứa ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708. Trong thực tế, bước lai giống hữu tính cây với chính nó, nghĩa là, tự thụ phấn, có thể được thực hiện hoặc dễ dàng thực hiện bởi con người, ví dụ: bằng cách thu thập phấn hoa của cây và tiếp xúc phấn hoa này với vòi nhụy hoặc núm nhụy của cùng cây đó và sau đó ngăn cản một cách tùy ý sự sinh sản thêm của cây; thao tác bởi con người và/hoặc các hoạt động loại bỏ, tiêu diệt, hoặc che đậy nhị hoa hoặc bao phấn của các cây gần kề khác (ví dụ, bằng cách bẻ cờ hoặc bằng cách sử dụng hóa chất diệt giao tử) sao cho ngăn cản sự tự thụ phấn chéo xảy ra và bắt buộc sự tự thụ phấn phải xảy ra nhằm tạo ra thế hệ con; bởi côn trùng thay thế con người thụ phấn ở vị trí để xảy ra "sự thụ phấn trực tiếp" (ví dụ, bằng cách nhốt riêng côn trùng thụ phấn với cây); bằng thao tác của con người đối với hoa hoặc các bộ phận của nó để cho phép tự thụ phấn; bằng cách thay thế có chọn lọc các cây (ví dụ, trồng có chủ ý các cây quá khoảng cách thụ phấn gần); và/hoặc bằng cách sử dụng hóa chất để thúc đẩy nở hoa hoặc để thúc đẩy khả năng tiếp nhận (của núm nhụy đối với phấn hoa).

Cây và hạt cây đậu tương thế hệ con lai được bao hàm bởi các phương pháp này và được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp này sẽ phân biệt được với cây đậu tương khác, ví dụ, do các cây và hạt cây đậu tương thế hệ con lai: tái tổ hợp và được tạo ra bởi sự can thiệp của con người; chịu được thuốc diệt cỏ dicamba; chứa ít nhất một

alen gồm có ADN chuyển gen trong sáng chế; và/hoặc chứa lượng có thể phát hiện được của trình tự polynucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2. Hạt có thể được chọn từ cây thế hệ con lai, và miễn là hạt này chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, đều thuộc phạm vi của sáng chế.

Trong thực hiện sáng chế, hai cây chuyển gen khác nhau có thể được lai với nhau để tạo ra cây con lai chứa hai gen khác loại riêng biệt một cách độc lập. Sự tự thụ phấn của thế hệ con lai thích hợp có thể tạo ra cây đồng hợp tử đối với cả hai gen. Phép lai ngược đối với cây bố mẹ và lai cùng giống với cây không chuyển gen cũng được dự kiến, như sự nhân giống sinh dưỡng. Các phương pháp gây giống khác được mô tả mà thường được sử dụng để lai các tính trạng và các cây trồng khác nhau có thể được tìm thấy trong một trong nhiều tài liệu tham khảo, ví dụ, Fehr, in *Breeding Methods for Cultivar Development*, Wilcox J. ed., American Society of Agronomy, Madison WI (1987).

Cây và hạt được sử dụng trong các phương pháp được bộc lộ trong sáng chế có thể cũng chứa một hoặc nhiều gen chuyển bổ sung. Gen chuyển đó có thể là trình tự nucleotit bất kỳ mã hóa protein hoặc phân tử ARN để tạo ra tính trạng mong muốn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng kháng sâu bọ tăng, hiệu quả sử dụng nước tăng, tính năng hiệu suất tăng, khả năng chịu hạn tăng, chất lượng hạt tăng, chất lượng dinh dưỡng được cải thiện và/hoặc khả năng chịu thuốc diệt cỏ tăng so với cây đậu tương thiếu gen chuyển bổ sung đó.

Do đó, phương pháp theo sáng chế là hữu ích cho, trong số các lợi ích khác, để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng trong khi cây đang sinh trưởng nhằm sản xuất hạt và/hoặc phần của cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương cho các mục đích nông nghiệp hoặc nghiên cứu, chọn thế hệ con lai chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương để nhân giống hoặc các mục đích nghiên cứu, và sản xuất cây và hạt thế hệ con lai chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương.

Cây, thế hệ con lai, hạt, tế bào cây, phần của cây (chẳng hạn phần hoa, nõn, quả, hoa, rễ hoặc mô của thân và lá), sản phẩm hàng hóa của sáng chế có thể được đánh giá bởi thành phần ADN, biểu hiện gen, và/hoặc biểu hiện protein. Sự đánh giá đó có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp tiêu chuẩn như PCR, thẩm tách

Northern, thẩm tách Southern, thẩm tách Western, kết tủa miễn dịch và ELISA hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện và/hoặc kit phát hiện được đề xuất theo sáng chế.

Phương pháp phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ tế bào, mô, hạt, hoặc cây của giống đậu tương MON 87708 trong mẫu được đề xuất. Phương pháp này bao gồm các bước: (i) chiết tách mẫu ADN từ ít nhất một tế bào, mô, hạt, hoặc cây đậu tương, (ii) cho mẫu ADN này tiếp xúc với cặp đoạn mồi mà có khả năng tạo ra amplicon từ sự kiện chuyển gen ADN MON 87708 trong điều kiện thích hợp để khuếch đại ADN, (iii) thực hiện phản ứng khuếch đại ADN, và sau đó (iv) phát hiện phân tử amplicon và/hoặc xác nhận rằng trình tự nucleotit của amplicon chứa trình tự nucleotit đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708, như trình tự nucleotit từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8. Amplicon được sử dụng là amplicon mà đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708, như amplicon chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. Phát hiện trình tự nucleotit đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708 trong amplicon xác định và/hoặc chẩn đoán sự có mặt ADN đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu. Ví dụ về cặp đoạn mồi mà có khả năng sản xuất amplicon từ sự kiện chuyển gen ADN MON 87708 trong điều kiện thích hợp để khuếch đại ADN được nêu trong SEQ ID NO: 10-11. Cặp đoạn mồi khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và chứa ít nhất một đoạn có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6. Phương pháp khác để phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ tế bào, mô, hạt, hoặc cây của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu, phương pháp này bao gồm các bước: (i) chiết tách mẫu ADN từ ít nhất một tế bào, mô, hạt, hoặc cây, (ii) cho mẫu ADN tiếp xúc với đầu dò ADN đặc trưng cho sự kiện chuyển gen ADN MON 87708, (iii) cho phép đầu dò và mẫu ADN lai trong điều kiện lai nghiêm ngặt, và sau đó (iv) phát hiện sự lai giữa đầu dò và mẫu ADN đích. Ví dụ về trình tự đầu dò ADN đặc trưng cho sự kiện chuyển gen ADN MON 87708 được nêu trong SEQ ID NO: 11. Cặp đoạn mồi khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ chứa ít nhất một đoạn có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6. Phát hiện sự lai của đầu dò với mẫu ADN là sự chẩn đoán cho sự có mặt của sự kiện chuyển gen ADN đặc trưng cho MON 87708 trong mẫu. Không xuất hiện việc lai tương ứng với việc không có mặt của ADN đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu

tương trong mẫu.

Kit phát hiện ADN được cung cấp mà hữu ích để nhận biết ADN của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu và cũng có thể được áp dụng đối với các phương pháp nhân giống cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen ADN thích hợp. Kit theo sáng chế chứa các đoạn môi và/hoặc đầu dò ADN chứa các đoạn có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-8. Một ví dụ về kit đã nêu bao gồm ít nhất phân tử ADN có chiều dài của các nucleotit liên tiếp vừa đủ của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 có chức năng là đầu dò ADN hữu ích để phát hiện sự có mặt và/hoặc không có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu. ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen đậu tương chuyển gen MON 87708 chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, và/hoặc SEQ ID NO: 8. Phân tử ADN đủ để sử dụng làm đầu dò ADN được cung cấp mà hữu ích để xác định, phát hiện, hoặc chẩn đoán sự có mặt và/hoặc không có mặt của ADN của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương ADN trong mẫu được cung cấp như trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11. Các đầu dò khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng và sẽ chứa ít nhất 15 nucleotit liên tiếp có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 và đủ đơn nhất đối với ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương nhằm nhận biết ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen. Loại kit khác chứa cặp đoạn môi hữu ích để tạo ra amplicon hữu ích nhằm phát hiện sự có mặt và/hoặc không có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen đậu tương chuyển gen MON 87708 trong mẫu. Kit khác để dùng trong phương pháp bao gồm cho mẫu ADN đích tiếp xúc với cặp đoạn môi như được mô tả theo sáng chế, sau đó thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic đủ để tạo ra amplicon chứa trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7, và/hoặc SEQ ID NO: 8, và sau đó phát hiện sự có mặt và/hoặc không có mặt của amplicon. Phương pháp đã nêu có thể còn bao gồm bước giải trình tự amplicon hoặc đoạn của nó, để xác định, nghĩa là, chẩn đoán cho sự có mặt của ADN đặc trưng trong sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu ADN đích. Các cặp đoạn môi khác có thể được thiết kế dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng và sẽ chứa ít nhất 15 nucleotit liên tiếp có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 và đủ đơn nhất đối với ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương nhằm để nhận biết ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen.

Sự khuếch đại axit nucleic có thể thực hiện được bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, kể cả các phương pháp khuếch đại nhiệt. Nhiều kỹ thuật được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để phát hiện, định lượng, và/hoặc giải trình tự amplicon thu được bởi các phương pháp này. Ví dụ, một kỹ thuật hữu ích để thực hiện sáng chế là TAQMAN® (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Kit và phương pháp phát hiện theo sáng chế là hữu ích để, trong số những lợi ích khác, nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, chọn các giống cây hoặc các cây lai chứa sự kiện chuyển gen MON 87708, phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu, và kiểm tra sự có mặt và/hoặc không có mặt của sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương hoặc cây và phần của cây chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu.

Trình tự của đoạn chèn ADN khác loại, các trình tự tiếp hợp, hoặc các trình tự kẹp sườn từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương (với các mẫu hạt tiêu biểu bao gồm sự kiện chuyển gen MON 87708 đã được nộp lưu tại ATCC PTA-9670) có thể được xác nhận (và được hiệu chỉnh nếu cần thiết) bằng cách khuếch đại các trình tự đó từ sự kiện chuyển gen có sử dụng các đoạn mồi có nguồn gốc từ các trình tự được cung cấp theo sáng chế theo sự trình tự mã ADN tiêu chuẩn của amplicon hoặc của ADN được tách dòng.

Theo sáng chế, thuật ngữ "bao gồm" nghĩa là "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở".

Các ví dụ sau đây được bao gồm để chứng minh các ví dụ về các phương án được ưu tiên nhất định của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá cao rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ mà sau khi trình bày các phương pháp tiếp cận này, sẽ thực hiện được sáng chế, và do đó có thể được xem là các ví dụ cấu thành đối với các mô hình ưu tiên để thực hiện sáng chế. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật khi đứng trên góc độ của bộc lộ này sẽ đánh giá cao rằng có thể đưa ra những sửa đổi đối với các phương án cụ thể đã được bộc lộ và vẫn thu được kết quả giống hoặc tương tự mà không vượt quá phạm vi và ý tưởng của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Biến nạp của A3525 đậu tương và chọn sự kiện chuyển gen MON 87708

Sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương đã được tạo ra bằng sự biến nạp gián tiếp bởi *Agrobacterium* của đậu tương. Tế bào đậu tương được biến nạp và tái sinh thành cây đậu tương hoàn chỉnh và từng cây này được lựa chọn đối với tính nguyên vẹn của cấu trúc biểu hiện của cây và có sức đề kháng với dicamba. Từ quần thể này, sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương đã được chọn và được mô tả đặc tính.

Cây đậu tương chuyển gen MON 87708 chịu được dicamba đã được phát triển thông qua sự biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium* từ mô phân sinh của cây đậu tương bằng cách sử dụng vectơ biến nạp PV-GMHT4355. Phương pháp đã được mô tả trong US 6,384,301 (được đưa vào bản mô tả làm tài liệu tham khảo), cho phép tạo ra các cây biến nạp mà không cần thông qua thể sần. Tóm lại, các mô phân sinh thu được từ túi phôi của hạt đậu tương A3525 đã mọc mầm (Asgrow, St Louis, MO). Sau khi nuôi cấy đồng thời với *Agrobacterium* mang vectơ, mô phân sinh này được cấy trên môi trường chọn lọc chứa glyphosate (Monsanto, St Louis, MO), muối carbenicillin dinatri, muối cefotaxim natri, và muối ticarcillin dinatri/hỗn hợp kali clavulanat để ức chế sự sinh trưởng của các tế bào cây được biến nạp và *Agrobacterium* dư. Các mô phân sinh sau đó được đặt trong môi trường thích hợp để phát triển chồi và rễ cây. Cây hoàn chỉnh có rễ với các tính chất kiểu hình đã được chọn và được đưa ra trồng vào đất phát triển và được đánh giá thêm.

Các cây RO đã được tạo ra thông qua sự biến nạp ở trên đã được chuyển ra đất trồng để sinh trưởng và sau đó được tự thụ phấn để tạo ra hạt R1. Trong quá trình tự thụ phấn tiếp theo của các cây RO để tạo ra thế hệ R1, các đoạn chèn chưa liên kết của T-ADN I (cấu trúc biểu hiện *dmo*) và T-ADN II (cấu trúc biểu hiện *cp4 epsps*) được phân tách. Sử dụng một lượng không gây chết của glyphosate cho cây R1. Cây bị tổn thương ít nhất được chọn cho các phân tích khác, trong đó các cây không có biểu hiện tổn thương, nghĩa là, chứa T-ADN II (cấu trúc biểu hiện *cp4 epsps*) được loại bỏ khỏi sự phát triển tiếp theo. Sau đó, các cây R0 chứa đoạn chèn T-ADN I (nghĩa là, cấu trúc gen *dmo*) đã được nhận biết. Cấu trúc biểu hiện T-ADN I chứa vùng khởi động của virus Peanut Chlorotic Streak (PCISV) có các vùng tăng cường gấp đôi (P-PCISV.FLt-enh); được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự dẫn đầu ADN có nguồn gốc từ ARN phiên mã của virus Etch của cây thuốc lá (L-TEV); được liên kết một cách có kiểm soát

với phân tử ADN mã hóa peptit đột biến trong lục lạp đầu N từ tiểu đơn vị ribuloza 1,5-bisphosphat carboxylaza (SSU) của *Pisum sativum* (TS-RbcS-3C); được liên kết một cách có kiểm soát với một phần của protein trưởng thành từ đơn vị tiểu đơn vị ribuloza 1,5-bisphosphat carboxylaza (SSU) của *Pisum sativum* (CR-RbcS-3C); được liên kết một cách có kiểm soát với phân tử ADN mã hóa mono-oxygenaza (DMO) dicamba của *Stenotrophomonas maltophilia* (*Pseudomonas maltophilia* là tên gốc của nguồn chứa gen DMO. Sinh vật nguồn này sau đó được phân loại ban đầu là *Xanthomonas maltophilia* và sau đó là *Stenotrophomonas maltophilia*); được liên kết một cách có kiểm soát với phân tử 3' UTR ADN có nguồn gốc từ gen tiểu đơn vị ribuloza 1,5-bisphosphat carboxylaza của *Pisum sativum* (T-Ps.RbcS2-E9). Cây được chọn bằng cách kết hợp các kỹ thuật phân tích, bao gồm phân tích TaqMan, PCR và phun thuốc diệt cỏ. Sự kiện chuyển gen MON 87708 được chọn trong số gần 2400 sự kiện chuyển gen riêng biệt trên cơ sở phân tích các đặc tính kiểu hình vượt trội và phân tích đặc trưng phân tử đã biết, và sự liên kết haplotype mong muốn. Sự kiện chuyển gen MON 87708 sau đó được lai với sự kiện chuyển gen MON 89788 (chịu được glyphosate). Thế hệ con lai của sự lai này được xử lý với dicamba (Clarity®, BASF, Research Triangle Park, NC), glyphosate (Roundup WeatherMAX®, Monsanto Co., St Louis, MO), hoặc được xử lý đồng thời với dicamba và glyphosate. Các xử lý đã được thực hiện vào lúc trước khi trồng, sau khi trồng cây ở giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng 3 (V3) và sau khi trồng cây ở giai đoạn tái sản xuất 1 (R1). Cây được xử lý được tính phần trăm sự ức chế sinh trưởng vào ngày 14 sau khi xử lý (DAT) đối với việc xử lý bằng thuốc diệt cỏ trước khi trồng cây, 3DAT đối với việc xử lý sau khi mọc mầm tại giai đoạn VE, và đối với việc xử lý sau khi mọc mầm 3 DAT tại giai đoạn R1. (Các) thuốc diệt cỏ đã được sử dụng với các tỷ lệ khác nhau trên mỗi hecta được trình bày trong bảng 1. Các phép đo sự ức chế theo phần trăm biểu hiện giá trị trung bình của các lần lặp lại.

Bảng 1: Thử nghiệm khả năng chịu Dicamba và/hoặc Roundup WeatherMAX® bởi MON89788 x MON 87708

Thuốc diệt cỏ (Tỷ lệ gm/ha (lb/a))	% ức chế tại 14 DAT TRƯỚC	% ức chế tại 3 DAT SAU (V3)	% ức chế tại 3 DAT SAU (R1)
Không xử lý/không có thuốc diệt cỏ	0,0	0,0	0,0
Roundup WeatherMAX® (3364 (3,0))	0,0	0,0	0,0

Thuốc diệt cỏ (Tỷ lệ gm/ha (lb/a))	% ức chế tại 14 DAT TRƯỚC	% ức chế tại 3 DAT SAU (V3)	% ức chế tại 3 DAT SAU (R1)
Clarity® (2244 (2,0))	0,0	10,0	20,0
Clarity®561 (0,5) và Roundup WeatherMAX® (841 (0,75))	0,0	5,0	10,0
Clarity® (1120 (1,0)) và Roundup WeatherMAX® (1682 (1,5))	0,0	7,5	12,5
Clarity® (2244 (2,0)) và Roundup WeatherMAX® (3364 (3,0))	0,0	22,5	25,0

Gen chịu thuốc diệt cỏ đã được sắp đặt trong sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương để liên kết nhóm 9 tại vị trí sắp đặt gần 143.5. Cửa sổ haplotype kết hợp 19743 và 19767 không có ảnh hưởng lên năng suất, sự chín, chiều cao hoặc sự đổ rạp. Thông tin kết hợp haplotype đã được cung cấp trong bảng 2 trong đó GM_A92205 chỉ định sự kiện chuyển gen MON 87708.

Bảng 2: Sự kết hợp Haplotype LG9, Pos 143.5

Sự kiện chuyển gen	Cửa sổ haplotype	ID haplotype	Năng suất	Sự chín	Chiều cao	Sự đổ rạp	Trình tự haplotype	Nhóm liên kết
GM_A92205	19743	1573355	0,00	-0,03	0,06	0,04	CGCTG	9
GM_A92205	19743	1573357	0,00	0,07	-0,03	-0,04	CGCTA	9
GM_A92205	19743	1573371	0,00	-0,09	-0,41	-0,09	CCCTG	9
GM_A92205	19743	1573373	0,00	-0,20	-0,01	-0,03	TG*GG	9
GM_A92205	19743	1573374	0,00	-0,08	-0,07	0,05	TG*GA	9
GM_A92205	19743	1573375	0,00	-0,15	0,05	0,04	CCCTA	9
GM_A92205	19743	1573376	0,00	-0,45	-0,14	0,00	TC*GG	9
GM_A92205	19767	1573486	0,00	0,00	-0,03	0,00	TACGGTC	9
GM_A92205	19767	1573493	0,00	0,00	0,22	0,00	AACAATT	9
GM_A92205	19767	1573494	0,00	0,00	0,03	0,00	TACAATC	9
GM_A92205	19767	1573495	0,00	0,00	0,07	0,00	TGAAACC	9
GM_A92205	19767	1573497	0,00	0,00	0,41	0,00	TACGGTT	9
GM_A92205	19767	1573499	0,00	0,00	-0,01	0,00	TGAAACT	9
GM_A92205	19767	1573500	0,00	0,00	0,06	0,00	TGAGACC	9
GM_A92205	19767	1573502	0,00	0,00	-0,07	0,00	AACAATC	9

Sự kiện chuyển gen	Cửa sổ haplotype	ID haplotype	Năng suất	Sự chín	Chiều cao	Sự đổ rạp	Trình tự haplotype	Nhóm liên kết
GM_A92205	19767	1573503	0,00	0,00	0,08	0,00	AACGATC	9
GM_A92205	19767	1573504	0,00	0,00	0,07	0,00	TACAGTC	9
GM_A92205	19767	1573506	0,00	0,00	-0,03	0,00	AACGATT	9
GM_A92205	19767	1573507	0,00	0,00	0,20	0,00	TGAAATT	9

Ví dụ 2: Mô tả đặc điểm của các trình tự ADN trong MON 87708

ADN được chèn vào hệ gen của cây đậu tương MON 87708 và trình tự kẹp sườn đã được mô tả đặc tính bằng các phân tích phân tử chi tiết. Các phân tích này bao gồm: trình tự chèn, số lượng đoạn chèn (số vị trí tích hợp trong hệ gen đậu tương), số bản sao (số lượng bản sao của ADN chuyển trong mỗi vị trí), tính nguyên vẹn của cấu trúc gen được chèn, các trình tự kẹp sườn và sự kết hợp của đoạn chèn với các vùng haplotype của hệ gen đậu tương).

Các đầu dò ADN phân tử đã được sử dụng bao gồm các vùng ghi mã nguyên vẹn và các bộ phân điều hòa tương ứng của nó, các vùng khởi động, các intron, và các trình tự polyadenyl hóa của cấu trúc biểu hiện của cây. Kết quả phân tích cho thấy rằng MON 87708 chứa đoạn chèn ADN gen chuyển đơn có một bản sao của cấu trúc biểu hiện. Các phân tích trình tự PCR và ADN ngược đã được thực hiện để xác định các đoạn tiếp hợp hệ gen chèn vào cây 5' và 3', xác nhận sự tổ chức của các yếu tố trong đoạn chèn (Fig.1), và xác định trình tự ADN hoàn thiện của đoạn chèn trong cây đậu tương MON 87708 (theo sáng chế là trình tự được nêu trong SEQ ID NO: 5). Cây đậu tương chứa các yếu tố di truyền gen chuyển được liên kết với hệ gen của nó được trình bày trong Fig.1 và kháng dicamba là một khía cạnh của sáng chế.

Các trình tự kẹp sườn đoạn chèn ADN gen chuyển trong MON 87708 đã được xác định bằng cách sử dụng PCR ngược như được mô tả trong Ochman et al., 1990 (PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc.) và/hoặc các kỹ thuật dịch chuyển gen. ADN hệ gen của cây đã được phân lập từ cả hai dòng đậu tương A3525 và đậu tương chuyển gen từ mô được sinh trưởng trong điều kiện nhà kính chuẩn. Khoảng 1 gam mô lá non đã được đưa vào trong nitor lỏng và được nghiền thành bột mịn

bằng cối mã não và chày. ADN được chiết bằng cách sử dụng kit chiết tách ADN hệ gen Nucleon™ PhytoPure™ (RPN8511, Amersham, Piscataway, NJ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau bước kết tủa cuối cùng, ADN được tái huyền phù hóa trong 0,5 ml TE (Tris-HCl 10mM có pH = 8,0, EDTA 1mM). Phương pháp này có thể được cải biến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng để chiết tách ADN từ mô bất kỳ của cây đậu tương, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hạt. Một phần ADN được cắt bằng enzym giới hạn được chọn dựa trên điểm phân cắt giới hạn của ADN gen chuyển. Sau khi nối các đoạn cắt bởi enzym giới hạn, PCR đã được thực hiện bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế từ trình tự ADN gen chuyển để khuếch đại các trình tự kéo dài từ đầu 5' đến đầu 3' của ADN gen chuyển. Các sản phẩm PCR đã được tách ra bằng cách điện di gel agarosa và được tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế gel QIAGEN (Qiagen, Valencia, CA). Các sản phẩm ADN tiếp theo được giải trình tự trực tiếp bằng cách sử dụng các phương thức giải trình tự ADN chuẩn. Trình tự kẹp sườn 5' mà kéo dài đến trình tự mép phải của ADN gen chuyển có cấu trúc biểu hiện được mô tả trong SEQ ID NO: 3 [C], xem Fig. 1). Trình tự kẹp sườn 3' mà kéo dài đến trình tự mép trái của ADN gen chuyển có cấu trúc biểu hiện được mô tả trong SEQ ID NO: 4 [D], xem Fig. 1). Phần của ADN có cấu trúc biểu hiện mà được tích hợp đầy đủ vào trong ADN hệ gen của A3525 được mô tả là trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 [E], xem Fig. 1).

Các trình tự phân tử ADN phân lập được so sánh với trình tự ADN gen chuyển để nhận biết trình tự kẹp sườn và đoạn ADN gen chuyển được phân lập đồng thời. Việc xác nhận sự có mặt của cấu trúc biểu hiện thu được bằng PCR với các đoạn mồi được thiết kế dựa trên dữ liệu trình tự kẹp sườn được suy ra và trình tự ADN gen chuyển đã biết. Trình tự kiểu đại tương ứng với vùng mà trong đó ADN gen chuyển đã được tích hợp trong dòng biến nạp được phân lập bằng cách sử dụng các đoạn mồi được thiết kế từ các trình tự kẹp sườn trong MON 87708. Các phản ứng PCR được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống khuếch đại Elongase® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Các trình tự ADN kẹp sườn trong MON 87708 và các trình tự kiểu đại A3525 được phân tích với nhiều cơ sở dữ liệu nucleotit và protein. Thông tin này đã được sử dụng để nghiên cứu mối quan hệ giữa gen chuyển đối với hệ gen của cây và để tìm kiếm tính nguyên vẹn trong vị trí chèn. Trình tự kẹp sườn và các trình tự kiểu đại đã được sử dụng để thiết kế các đoạn mồi cho các xét nghiệm điểm cuối TAQMAN® được sử dụng để nhận biết sự

kiện chuyển gen. Các xét nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử đã được phát triển sử dụng thông tin này.

Ví dụ 3: Xét nghiệm TAQMAN® điểm cuối đặc trưng cho sự kiện chuyển gen

Ví dụ này mô tả phương pháp khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm cuối đặc trưng cho sự kiện chuyển gen được phát triển để nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 trong mẫu. Các ví dụ thuận lợi với phương pháp TAQMAN® điểm cuối đặc trưng cho sự kiện chuyển gen MON 87708 bao gồm các bước: bước 1: nước có điện trở 18 mΩ được điều chỉnh đến thể tích cuối là 10 µl. Bước 2: 5,0 µl của Universal Master Mix 2X (dNTPs, enzym, chất đệm) đến nồng độ cuối cùng là 1X. Bước 3: 0,5 µl hỗn hợp đoạn môi-1 cho sự kiện chuyển gen (SQ13570) và đoạn môi-2 cho sự kiện chuyển gen (SQ13571) (được huyền phù hóa trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ 20 µM cho mỗi đoạn môi) đến nồng độ cuối là 1,0 µM (ví dụ, trong ống ly tâm cực nhỏ, các yếu tố sau đây sẽ được bổ sung để đạt đến 500 µl ở nồng độ cuối là 20µM: 100 µl đoạn môi SQ13570 (SEQ ID NO: 9) ở nồng độ 100 µM; 100 µl đoạn môi SQ13571 (SEQ ID NO: 10) ở nồng độ 100 µM; 300 µl nước có điện trở 18 mΩ). Bước 4: 0,2 µl đầu dò PB4655 của sự kiện chuyển gen có nhãn 6-FAM™ (được tái huyền phù hóa trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ cuối là 10 µM (SEQ ID NO: 11) đến nồng độ cuối là 0,2 µM. Bước 5: 0,5 µl hỗn hợp đoạn môi đối chứng cực bộ-1 và đoạn môi đối chứng cực bộ -2 (được tái huyền phù hóa trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ là 20 µM cho mỗi đoạn môi) đến nồng độ cuối cùng là 1,0 µM. Bước 6: 0,2 µl đầu dò Internal Control VIC™ đến nồng độ cuối cùng là 0,2 µM (được tái huyền phù hóa trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ cuối là 10 µM) Bước 7: 3,0 µl ADN đã chiết tách (khuôn) cho mỗi mẫu với từng chất sau đây bao gồm: 1. Các mẫu lá cần được phân tích; 2. Đối chứng âm (ADN không chuyển gen); 3. Đối chứng nước âm (không có khuôn); 4. MON 87708 ADN đối chứng dương. Bước 8: Điều kiện máy luân nhiệt như sau: Một chu kỳ tại 50°C trong 2 phút; một chu kỳ tại 95°C trong 10 phút; mười chu kỳ tại 95°C trong 15 giây, sau đó tại 64°C trong 1 phút với -1°C/chu kỳ; ba mươi chu kỳ tại 95°C trong 15 giây sau đó tại 54°C trong 1 phút; chu kỳ cuối cùng tại 10°C.

Các đoạn môi ADN được sử dụng trong xét nghiệm điểm cuối là các đoạn môi SQ13570 (SEQ ID NO: 9), SQ13571 (SEQ ID NO: 10) và đầu dò PB4655 nhãn 6FAM™ (SEQ ID NO: 11. 6-FAM™ là sản phẩm thuốc nhuộm huỳnh quang của Applied Biosystems (Foster City, CA) được gắn với đầu dò ADN. Đối với các đầu dò

For TAQMAN® MGB™, hoạt tính enzym ngoài nhân 5' của polymeraza Taq ADN phân cắt đầu dò từ đầu 5', giữa tín hiệu phát huỳnh quang và tín hiệu dập tắt huỳnh quang. Khi được lai với ADN đích, tín hiệu dập tắt huỳnh quang và tín hiệu phát huỳnh quang được tách ra đủ để tạo ra tín hiệu huỳnh quang, do đó phát huỳnh quang. SQ13570 (SEQ ID NO: 9) và SQ13571 (SEQ ID NO: 10) khi được sử dụng trong các phương pháp phản ứng này với PB4655 (SEQ ID NO: 11) tạo ra amplicon ADN có thể chẩn đoán cho sự kiện chuyển gen ADN trong MON 87708. Các đối chứng cho phân tích này bao gồm đối chứng dương từ cây đậu tương chứa ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708, đối chứng âm từ cây đậu tương không chuyển gen, và đối chứng âm không chứa ADN khuôn. Ngoài ra, đối chứng cho phản ứng PCR bao gồm các đoạn mỗi đối chứng cục bộ và đầu dò đối chứng cục bộ, đặc trưng cho gen sao chép đơn trong hệ gen Glycine. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng sẽ biết cách thiết kế đoạn mỗi đặc hiệu cho gen sao chép đơn trong hệ gen Glycine. Các xét nghiệm này được tối ưu hóa để sử dụng với hệ thống PCR 9700 Applied Biosystems GeneAmp® (chạy tại tốc độ lớn nhất) hoặc máy luân nhiệt MJ Research ADN Engine PTC-225. Các phương pháp khác và thiết bị khác được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tương ứng biết mà tạo ra amplicon nhận biết ADN trong sự kiện chuyển gen MON 87708 là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các cây RO chứng minh sự có mặt của cấu trúc biểu hiện được cho phép phát triển thành các cây trưởng thành hoàn chỉnh. Các đầu dò được thiết kế trên cơ sở các trình tự của cấu trúc gen chuyển chịu dicamba đã được sử dụng cho các thử nghiệm dò thăm tách Southern để xác định liên kết. Các cây R0 cũng đã được đánh giá đối với số bản sao của cấu trúc biểu hiện sử dụng sự kết hợp của phân tích Southern và TAQMAN® điểm cuối.

Xét nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử là hữu ích để xác định nếu cây chứa sự kiện chuyển gen là đồng nhất với sự kiện chuyển gen ADN; mà chứa ADN ngoại sinh trong cùng vị trí trên mỗi nhiễm sắc thể của cặp nhiễm sắc thể; hoặc khác với sự kiện chuyển gen ADN, mà bao gồm ADN ngoại sinh chỉ trên một nhiễm sắc thể của cặp nhiễm sắc thể; hoặc không có giá trị đối với sự kiện chuyển gen ADN, là thuộc kiểu đại. Phương pháp khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm cuối cũng đã được sử dụng để phát triển các xét nghiệm tình trạng tiếp hợp giao tử cho sự kiện chuyển gen MON 87708. Ví dụ này mô tả phương pháp khuếch đại nhiệt TAQMAN® điểm cuối đặc trưng cho sự kiện

chuyển gen được phát triển để xác định tình trạng tiếp hợp giao tử của sự kiện chuyển gen MON 87708 trong mẫu. Đối với xét nghiệm này, ba đoạn mồi đã được sử dụng trong đó đoạn mồi SQ20632 (SEQ ID NO: 12) lai và kéo dài đặc biệt từ đoạn tiếp hợp 3' của ADN ngoại sinh được chèn và ADN hệ gen, đoạn mồi SQ20636 (SEQ ID NO: 13) lai và kéo dài đặc biệt từ ADN kẹp sườn bên 3' của ADN ngoại sinh được chèn và đoạn mồi SQ20637 (SEQ ID NO: 14) lai và kéo dài đặc biệt từ ADN hệ gen tới đoạn được tích hợp ADN ngoại sinh được chèn. Ba đoạn mồi chẩn đoán cho sự kiện chuyển gen. Trong ví dụ này, đoạn mồi SQ20636 (SEQ ID NO: 13) và đoạn mồi SQ20632 (SEQ ID NO: 12) và đầu dò PB10130 oligonucleotit có nhãn 6-FAM™ (SEQ ID NO: 15) chẩn đoán khi có một bản sao của ADN ngoại sinh được chèn. Trong ví dụ này, SQ20636 (SEQ ID NO: 13) và đoạn mồi SQ20637 (SEQ ID NO: 14) và đầu dò PB10131 oligonucleotit nhãn VIC™ (SEQ ID NO: 16) chẩn đoán khi không có bản sao của ADN ngoại sinh được chèn có trong ADN hệ gen, nghĩa là, kiểu dại. Khi ba đoạn mồi và hai đầu dò được trộn với nhau trong phản ứng PCR với ADN được chiết tách từ cây đồng nhất với sự kiện chuyển gen MON 87708, không có tín hiệu huỳnh quang chỉ từ đầu dò PB10130 oligonucleotit nhãn 6-FAM™ (SEQ ID NO: 15) cho thấy rõ và chẩn đoán cho cây đồng nhất với sự kiện chuyển gen MON 87708. Khi ba đoạn mồi và hai đầu dò được trộn với nhau trong phản ứng PCR với ADN được chiết tách từ cây khác loại với sự kiện chuyển gen MON 87708, không có tín hiệu huỳnh quang chỉ từ đầu dò PB10130 oligonucleotit nhãn 6-FAM™ (SEQ ID NO: 15) và đầu dò PB10131 oligonucleotit nhãn VIC™ (SEQ ID NO: 16) cho thấy rõ và chẩn đoán cho cây khác loại với sự kiện chuyển gen MON 87708. Khi ba đoạn mồi và hai đầu dò được trộn với nhau trong phản ứng PCR với ADN được chiết tách từ cây mà không có giá trị cho sự kiện chuyển gen MON 87708 (nghĩa là, kiểu dại), có tín hiệu huỳnh quang từ chỉ đầu dò PB10131 oligonucleotit nhãn VIC™ (SEQ ID NO: 16) cho thấy rõ và chẩn đoán là không phải sự kiện chuyển gen MON 87708, nghĩa là, kiểu dại. Các ví dụ về điều kiện có ích với phương pháp này như sau: Bước 1: nước có điện trở 18 mΩ được điều chỉnh đến thể tích cuối là 10 µl. Bước 2: 5,0 µl của Universal Master Mix 2X (Applied Biosystems cat # 4304437; dNTPs, enzym, chất đệm) đến nồng độ cuối là 1X. Bước 3: 0,5 µl của đoạn mồi xác định tình trạng tiếp hợp giao tử SQ20632, SQ20636, SQ20637 (được tái huyền phù hóa trong nước có điện trở 18 mΩ đến nồng độ là 20 µM đối với mỗi đoạn mồi) đến nồng độ cuối là 1,0 µM. Bước 4: 0,2 µl đầu dò PB10130 nhãn 6-FAM™ (SEQ ID NO:

15) (được huyền phù hóa trong 18 mΩ nước đến nồng độ 10 μM) đến nồng độ cuối là 0,2 μM. Bước 5: 0,2 μl đầu dò PB10131 nhãn VIC™ (SEQ ID NO: 16) (được tái huyền phù hóa trong 18 mΩ nước đến nồng độ 10 μM) đến nồng độ cuối là 0,2 μM. Bước 6: 3,0 μl ADN đã chiết tách (khuôn) cho mỗi mẫu với từng chất sau đây bao gồm: 1. Các mẫu lá cần phân tích (4-80 ng của ADN hệ gen đã được pha loãng trong nước); 2. Đối chứng âm (ADN đậu tương không chuyển gen; 4 ng đã được pha loãng trong nước); 3. Đối chứng nước âm (không khuôn; dung dịch trong đó ADN đã được tái huyền phù hóa); 4. ADN hệ gen từ MON 87708 đối chứng âm từ sự kiện chuyển gen khác loại (4ng được pha loãng trong nước); 5. 4. ADN hệ gen từ MON 87708 đối chứng dương từ sự kiện chuyển gen đồng nhất (4ng được pha loãng trong nước). Bước 7: Trộn nhẹ. Bước 8: Điều kiện máy luân nhiệt khi sử dụng hệ thống PCR 9700 Applied Biosystems GeneAmp® (chạy ở tốc độ lớn nhất) hoặc máy luân nhiệt MJ Research ADN Engine PTC-225 là như sau: Một chu kỳ tại 50°C trong 2 phút; một chu kỳ tại 95°C trong 10 phút; mười chu kỳ tại (95°C trong 15 giây sau đó 64°C trong 1 phút (-1°C/chu kỳ)); ba mươi chu kỳ tại (95°C trong 15 giây sau đó tại 54°C trong 1 phút); tùy ý thêm 10 đến 20 chu kỳ (95°C trong 15 giây sau đó tại 64°C trong 1 phút (-1°C/chu kỳ)) có thể được tạo ra sự tách quần thể phân biệt hơn trong phép phân tích TaqMan® điểm cuối; giữ một chu kỳ tại 10°C.

Ví dụ 4: Nhận biết sự kiện chuyển gen MON 87708 trong hoạt động nhân giống MON 87708 bất kỳ

Ví dụ sau mô tả cách nhận biết MON 87708 trong thế hệ con lai của hoạt động gây giống bất kỳ sử dụng cây đậu tương chứa sự kiện MON 87708.

Cặp đoạn môi chứa sự kiện chuyển gen ADN được sử dụng để tạo ra amplicon xác định sự kiện chuyển gen MON 87708. Amplicon chẩn đoán sự kiện MON 87708 chứa ít nhất một trình tự tiếp hợp, được đề cập theo sáng chế là SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8. Các cặp đoạn môi cho sự kiện chuyển gen sẽ tạo ra amplicon chẩn đoán cho MON 87708 bao gồm cặp đoạn môi trên cơ sở các trình tự kẹp sườn và cấu trúc biểu hiện được chèn. Để thu được amplicon chẩn đoán phát hiện SEQ ID NO: 1, đoạn môi được thiết kế ở phía trước dựa theo trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 tính từ các bazơ 1 đến 1126 và đoạn môi ngược được thiết kế dựa theo trình tự kẹp sườn 3' của cấu trúc biểu hiện được chèn, SEQ ID NO: 5 từ bazơ 1 đến 3003, trong đó các phân tử đoạn môi có chiều dài vừa đủ bao gồm các nucleotit liền kề

để lai một cách đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5. Để thu được amplicon chẩn đoán trong đó SEQ ID NO: 2 được tìm thấy, một nucleotit sẽ thiết kế phân tử đoạn môi ở phía trước dựa trên catxét biểu hiện được chèn, SEQ ID NO: 5 từ các vị trí 1 qua 3003 và phân tử đoạn môi ngược dựa trên trình tự kẹp sườn 3', SEQ ID NO: 4 từ bazơ 131 đến 1947, trong đó các phân tử đoạn môi có chiều dài vừa đủ gồm các nucleotit liền kề để lai một cách đặc hiệu với trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5. Thực tiễn, phân tử môi được thiết kế để tạo ra các amplicon có phạm vi kích cỡ được giới hạn, ví dụ, từ 100 đến 1000 bazơ. Các amplicon có kích thước ngắn hơn (chiều dài polynucleotit ngắn hơn) đều có thể được tạo ra dễ dàng trong các phản ứng PCR, với thời gian luân nhiệt ngắn hơn, và dễ dàng được tách ra và được hiển thị trên gel agarza trong các xét nghiệm giống như TAQMAN® điểm cuối. Các amplicon ngắn hơn có thể được tạo ra và được phát hiện bằng các phương pháp phát hiện amplicon đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ngoài ra, các amplicon được tạo ra bằng cách sử dụng các cặp đoạn môi có thể được tách dòng vào vectơ, được nhân giống, được phân lập và được giải trình tự hoặc có thể được giải trình tự trực tiếp bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cặp đoạn môi bất kỳ có bắt nguồn từ việc kết hợp trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 5 hoặc việc kết hợp trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4 và SEQ ID NO: 5 mà hữu ích trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra amplicon chẩn đoán MON 87708 hoặc thể hệ con lai của nó và là một khía cạnh của sáng chế. Mỗi phân tử đoạn môi polynucleotit ADN bất kỳ được phân lập chứa ít nhất 11 nucleotit liên tiếp của trình tự SEQ ID NO: 3, hoặc các trình tự bổ sung của nó, đều hữu ích trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra amplicon chẩn đoán MON 87708 hoặc thể hệ con lai của nó là một khía cạnh của sáng chế. Mỗi phân tử đoạn môi polynucleotit ADN bất kỳ được phân lập chứa ít nhất 11 nucleotit liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 4, hoặc các trình tự bổ sung của nó, mà hữu ích trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra amplicon chẩn đoán MON 87708 hoặc thể hệ con lai của nó là một khía cạnh của sáng chế. Mỗi phân tử đoạn môi polynucleotit ADN được phân lập bất kỳ chứa ít nhất 11 nucleotit liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5, hoặc các trình tự bổ sung của nó, mà hữu ích trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra amplicon chẩn đoán MON 87708 hoặc thể hệ con lai của nó là một khía cạnh của sáng chế.

Ví dụ về điều kiện khuếch đại cho phân tích này được minh họa trong Ví dụ 3. Tuy

nhiên, việc cải tiến bất kỳ đối với các phương pháp này hoặc việc sử dụng các đoạn môi ADN tương đồng hoặc bổ sung cho trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4 hoặc các trình tự ADN của các yếu tố di truyền có trong đoạn chèn gen chuyển (SEQ ID NO: 5) của MON 87708 mà tạo ra amplicon chẩn đoán cho MON 87708 đều thuộc phạm vi bộc lộ của sáng chế. Amplicon chẩn đoán bao gồm phân tử ADN tương đồng hoặc bổ sung cho ít nhất một ADN tiếp hợp gen chuyển/hệ gen (SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc SEQ ID NO: 7 hoặc SEQ ID NO: 8, hoặc phần cơ bản của nó).

Phép phân tích mẫu mô của cây từ sự kiện chuyển gen MON 87708 có thể bao gồm đối chứng dương từ sự kiện chuyển gen MON 87708, đối chứng âm từ cây đậu tương không phải là sự kiện chuyển gen MON 87708 (ví dụ., nhưng không chỉ giới hạn ở, A3525), và/hoặc đối chứng âm không chứa ADN hệ gen đậu tương. Cặp đoạn môi mà sẽ khuếch đại phân tử ADN đậu tương nội sinh có thể đáp ứng như đối chứng nội trong điều kiện khuếch đại ADN. Các trình tự đoạn môi bổ sung có thể được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 5 bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này để khuếch đại ADN, và các điều kiện được chọn để tạo ra amplicon bằng các phương pháp được trình bày trong Ví dụ 3 có thể khác, nhưng đều tạo ra amplicon chẩn đoán cho ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708. Sử dụng các trình tự đoạn môi ADN này với các cải biến đối với các phương pháp trong Ví dụ 3 đều thuộc phạm vi của sáng chế. Amplicon được tạo ra bởi ít nhất một trình tự đoạn môi ADN có nguồn gốc từ trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 5 để chẩn đoán cho MON 87708 là một khía cạnh của sáng chế.

Kit phát hiện ADN, chứa ít nhất một đoạn môi ADN có chiều dài vừa đủ gồm các nucleotit liên tiếp có nguồn gốc từ trình tự nêu trong SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, hoặc SEQ ID NO: 5 mà khi được sử dụng trong phương pháp khuếch đại ADN để tạo ra amplicon chẩn đoán MON 87708 hoặc thể hệ con lai của nó là một khía cạnh của sáng chế. Cây đậu tương, phần của cây, tế bào cây, hạt, hoặc hoặc sản phẩm hàng hóa từ cây đậu tương mà sẽ tạo ra amplicon chẩn đoán cho MON 87708 khi được thử nghiệm trong phương pháp khuếch đại ADN là một khía cạnh của sáng chế. Xét nghiệm cho amplicon MON 87708 có thể được thực hiện bằng cách sử dụng hệ thống PCR 9700 Applied Biosystems GeneAmp® (chạy với tốc độ lớn nhất) hoặc máy luân nhiệt MJ Research ADN Engine PTC-225 hoặc hệ thống khuếch đại bất kỳ mà có thể được sử

dụng để tạo ra amplicon chẩn đoán cho MON 87708 như được trình bày trong Ví dụ 3.

Số nộp lưu hạt tiêu biểu chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương được đề cập ở trên và trong yêu cầu bảo hộ đã được thực hiện theo Hiệp ước Budapest với Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110. Số truy cập ATCC của số nộp lưu này là PTA-9670. Số nộp lưu sẽ được bảo quản trong cơ sở lưu giữ với thời hạn là 30 năm, hoặc 5 năm sau yêu cầu cuối cùng, hoặc trong thời gian có hiệu lực của sáng chế, tùy theo thời gian nào dài hơn, và sẽ được thay thế, nếu cần, trong suốt thời kỳ đó.

Từ sự minh họa và các nguyên lý của sáng chế được mô tả, sáng chế sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong kỹ thuật, sáng chế có thể được sửa đổi khác với trình tự sắp xếp và trình bày chi tiết này mà không đi trệch khỏi các nguyên lý đó. Các sửa đổi nêu trên đều thuộc phạm vi và ý tưởng của sáng chế và đều nằm trong phạm vi được yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó.
2. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1.
3. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 2.
4. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3.
5. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 4.
6. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 5.
7. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 6.
8. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7.
9. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2.
10. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4.
11. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8.
12. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN tái tổ hợp này là ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, mẫu tiêu biểu của hạt chứa trình tự này đã được nộp lưu tại ATCC với số nộp lưu PTA-9670.
13. Phân tử ADN tái tổ hợp theo điểm 1, trong đó phân tử ADN tái tổ hợp này là ADN trong cây đậu tương, tế bào cây đậu tương, hạt đậu tương, phần của cây đậu tương, hoặc sản phẩm hàng hóa của đậu tương.

14. Đoạn mỗi ADN chứa trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ gồm trình tự nucleotit liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó, trong đó đoạn mỗi ADN này để chẩn đoán cho sự kiện chuyển gen MON 87708 và trong đó đoạn mỗi ADN này lai trong điều kiện lai nghiêm ngặt với phân tử ADN chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-4 và 6-8 và không lai trong điều kiện lai nghiêm ngặt với phân tử ADN không chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-4 và 6-8.

15. Đầu dò ADN chứa trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ gồm trình tự nucleotit liên tiếp nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó, trong đó đầu dò ADN này để chẩn đoán cho sự kiện MON 87708 và trong đó đầu dò ADN này lai trong điều kiện lai nghiêm ngặt với phân tử ADN chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-4 và 6-8 và không lai trong điều kiện lai nghiêm ngặt với phân tử ADN không chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-4 và 6-8.

16. Cặp phân tử ADN bao gồm phân tử ADN thứ nhất và phân tử ADN thứ hai khác với phân tử ADN thứ nhất, trong đó từng phân tử ADN thứ nhất và thứ hai này chứa các trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ bao gồm các nucleotit liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO:6 hoặc trình tự bổ sung đầy đủ của nó, có chức năng như các đoạn mỗi ADN khi chúng cùng được sử dụng trong phản ứng khuếch đại với ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 để tạo ra amplicon để phát hiện ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu.

17. Phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) cho mẫu tiếp xúc với đầu dò ADN theo điểm 15;
- b) đưa mẫu và đầu dò ADN đã nêu vào điều kiện lai nghiêm ngặt; và
- c) phát hiện sự lai của đầu dò ADN với phân tử ADN trong mẫu, trong đó sự lai của đầu dò ADN với phân tử ADN này chỉ ra sự có mặt của phân tử ADN từ sự kiện chuyển gen MOM 87708 của cây đậu tương trong mẫu.

18. Phương pháp phát hiện sự có mặt của phân tử ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) cho mẫu tiếp xúc với cặp phân tử ADN theo điểm 16;

- b) thực hiện phản ứng khuếch đại đủ để tạo ra amplicon ADN chứa trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-4, 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó; và
- c) phát hiện sự có mặt của amplicon ADN trong phản ứng, trong đó sự có mặt của amplicon ADN trong phản ứng này chỉ ra sự có mặt của phân tử ADN từ sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trong mẫu.

19. Phương pháp xác định tình trạng tiếp hợp giao tử của cây đậu tương hoặc hạt đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) cho mẫu chứa ADN đậu tương tiếp xúc với bộ đoạn mồi và bộ đầu dò có khả năng sản xuất amplicon thứ nhất và amplicon thứ hai;
- b) thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic với mẫu, bộ đoạn mồi và bộ đầu dò;
- c) phát hiện trong phản ứng khuếch đại axit nucleic này amplicon thứ nhất để phát hiện sự kiện chuyển gen MON 87708 và amplicon thứ hai để phát hiện ADN hệ gen đậu tương tự nhiên không chứa sự kiện chuyển gen MON 87708; và
- d) phân tích sự có mặt và/hoặc không có mặt amplicon thứ nhất và amplicon thứ hai đã nêu trong phản ứng khuếch đại axit nucleic, trong đó nếu có mặt của cả hai amplicon chỉ ra mẫu đã nêu là khác loại với sự kiện chuyển gen MON 87708 và nếu chỉ có mặt của amplicon thứ nhất chỉ ra mẫu đã nêu là đồng nhất với sự kiện chuyển gen MON 87708.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó bộ đoạn mồi bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14.

21. Phương pháp theo điểm 19, trong đó bộ đầu dò bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16.

22. Kit để phát hiện ADN, trong đó kit này bao gồm cặp đoạn mồi ADN hoặc ít nhất một đầu dò ADN, trong đó:

- a) cặp đoạn mồi ADN chứa ít nhất một phân tử ADN chứa trình tự nucleotit có chiều dài vừa đủ bao gồm trình tự nucleotit liên tiếp của trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 hoặc các trình tự bổ sung đầy đủ của nó, trong đó cặp đoạn mồi ADN có khả năng sản xuất amplicon để phát hiện sự kiện chuyển gen MON 87708; và
- b) ít nhất một đầu dò ADN để phát hiện sự kiện chuyển gen MON 87708.

23. Cây đậu tương tái tổ hợp, trong đó cây đậu tương này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa dicamba mono-oxygenaza (DMO).
24. Cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 23, trong đó cây đậu tương này có khả năng chịu được khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ dicamba.
25. Cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 23, trong đó hệ gen của cây đậu tương này tạo ra amplicon chứa phân tử ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó, khi được kiểm tra bằng phương pháp khuếch đại ADN.
26. Hạt của cây đậu tương tái tổ hợp, trong đó hạt này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa dicamba mono-oxygenaza (DMO).
27. Hạt của cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 26, trong đó hạt này có khả năng chịu được khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ dicamba.
28. Hạt của cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 26, trong đó hệ gen của hạt này tạo ra amplicon chứa phân tử ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó, khi được kiểm tra bằng phương pháp khuếch đại ADN.
29. Tế bào của cây đậu tương tái tổ hợp, trong đó tế bào này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa dicamba mono-oxygenaza (DMO).
30. Tế bào của cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 29, trong đó tế bào này có khả năng chịu được khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ dicamba.
31. Tế bào của cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 29, trong đó hệ gen của tế bào này tạo ra amplicon chứa phân tử ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó, khi được kiểm tra bằng phương pháp khuếch đại ADN.
32. Phần của cây đậu tương tái tổ hợp, trong đó phần của cây đậu tương này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa dicamba mono-oxygenaza (DMO).

33. Phần của cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 32, trong đó phần của cây đậu tương này có khả năng chịu được khi xử lý bằng thuốc diệt cỏ dicamba.
34. Phần của cây đậu tương tái tổ hợp theo điểm 32, trong đó hệ gen của phần của cây đậu tương này tạo ra amplicon chứa phân tử ADN được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó, khi được kiểm tra bằng phương pháp khuếch đại ADN.
35. Cây đậu tương, trong đó cây đậu tương này chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, mẫu tiêu biểu của hạt chứa sự kiện chuyển gen này được nộp lưu tại ATCC với số truy cập PTA-9670.
36. Cây đậu tương theo điểm 35, trong đó cây đậu tương này là dạng lai có ít nhất một cây bố mẹ chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương.
37. Hạt cây đậu tương, trong đó hạt cây đậu tương này chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương, mẫu tiêu biểu của hạt chứa sự kiện chuyển gen được nộp lưu tại ATCC với số truy cập PTA-9670.
38. Hạt cây đậu tương theo điểm 37, trong đó hạt cây đậu tương này là dạng lai có ít nhất một cây bố mẹ chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương.
39. Vật liệu thực vật không sống, trong đó vật liệu này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa dicamba mono-oxygenaza (DMO).
40. Sản phẩm hàng hóa, trong đó sản phẩm này chứa các trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2 và phân tử axit nucleic mã hóa dicamba mono-oxygenaza (DMO).
41. Sản phẩm hàng hóa theo điểm 40, trong đó sản phẩm hàng hóa này được chọn từ nhóm bao gồm hạt nguyên vẹn hoặc đã được chế biến, thức ăn động vật, dầu, bột xay thô, bột, gạo ép, cám, gạo được thổi phồng, sữa, pho mát, giấy, kem, rượu vang, rượu, sinh khối và các sản phẩm nhiên liệu.
42. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng, trong đó phương pháp này bao gồm bước trồng cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương trên cánh đồng và sử dụng một lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba để phòng trừ

cỏ dại trên cánh đồng mà không làm tổn thương cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 này.

43. Phương pháp theo điểm 42, trong đó lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba đã nêu nằm trong khoảng từ 2,27 g (0,005 pound) đến 3,63 kg (8 pound) trên 0,4 hecta (1 mẫu Anh: acre).

44. Phương pháp phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng, trong đó phương pháp này bao gồm bước sử dụng một lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba để phòng trừ cỏ dại trên cánh đồng và sau đó trồng cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 trên cánh đồng này.

45. Phương pháp theo điểm 44, trong đó lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba này nằm trong khoảng từ 2,27 g (0,005 pound) đến 3,63 kg (8 pound) trên 0,4 hecta (1 mẫu Anh: acre) và trồng cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương đã nêu trong vòng 14 ngày sử dụng lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba này.

46. Phương pháp sản xuất hạt cây đậu tương về cơ bản không có hạt của các loài cỏ dại độc hại, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) trồng cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 trên cánh đồng;
- b) sử dụng một lượng hữu hiệu của thuốc diệt cỏ dicamba cho cánh đồng để tiêu diệt cỏ dại độc hại trên cánh đồng này mà không làm tổn thương cây đậu tương chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 đã nêu; và
- c) thu hoạch hạt của cây đậu tương từ cánh đồng đã nêu.

47. Phương pháp theo điểm 46, trong đó hạt của các loài cỏ dại độc hại đã nêu được chọn từ nhóm bao gồm: *Cardaria* spp., *Heliotropium* spp., *Centaurea* spp., *Senecio* spp., *Crotalaria* spp., *Solanum* spp., *Xanthium* spp., *Amsinckia* spp., *Cassia* spp., *Sesbania* spp., *Datura* spp., *Ricinus* spp., *Argemone* spp., *Corchorus* spp., *Impomoea* spp. và *Echium* spp..

48. Phương pháp sản xuất cây đậu tương chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) lai chéo cây đậu tương chuyển gen chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương chứa phân tử nucleotit có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm

các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó với cây đậu tương thứ hai;

- b) chọn hạt được tạo ra từ sự lai chéo đã nêu;
- c) cho hạt đã nêu sinh trưởng để tạo ra các cây thế hệ con lai;
- d) xử lý các cây thế hệ con lai này với dicamba; và
- e) chọn cây thế hệ con lai chịu được dicamba.

49. Phương pháp sản xuất cây đậu tương chịu được việc sử dụng thuốc diệt cỏ dicamba, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- a) tự thụ phấn cây đậu tương chuyển gen chứa sự kiện chuyển gen MON 87708 của cây đậu tương chứa phân tử nucleotit có trình tự nucleotit được chọn từ nhóm bao gồm các trình tự nêu trong SEQ ID NO:1-4 và 6-8 và các trình tự bổ sung đầy đủ của nó;
- b) thu hạt được tạo ra từ sự tự thụ phấn đã nêu;
- c) cho hạt đã nêu sinh trưởng để tạo ra các cây thế hệ con lai;
- d) xử lý các cây thế hệ con lai này với dicamba; và
- e) chọn cây thế hệ con lai chịu được dicamba.

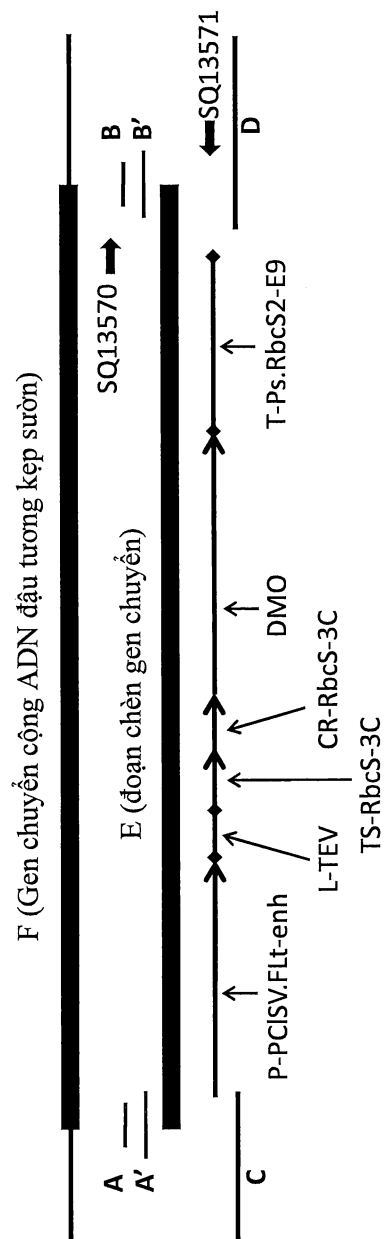


Fig. 1

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Monsanto Technology LLC
 Brinker, Ronald J
 Burns, Wen C.
 Feng, Paul C.C.
 Gupta, Anju
 Hoi, Soi-Wai
 Malven, Marianne
 Wu, Kunsheng
- <120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP CHỨA SỰ KIẾN CHUYỂN GEN MON 87708 CỦA CÂY ĐẬU
 TƯƠNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CÂY ĐẬU TƯƠNG CHỊU ĐƯỢC THUỐC DIỆT CỎ
- <130> 38-21(55544)0000
- <140> US 12/868,989
- <141> 2010-08-26
- <150> 61/243,227
- <151> 2009-09-17
- <160> 16
- <170> PatentIn phiên bản 3.5
- <210> 1
- <211> 60
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Phân tử ADN khảm của ADN hệ gen ADN của cây đậu tương và ADN gen
 chuyển
- <400> 1
 ttgatctcca tgagccattt agtctcacct tcaaacactg atagttttaa ctgaaggcgg 60
- <210> 2
- <211> 60
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Phân tử ADN khảm của hệ gen ADN của cây đậu tương và ADN gen chuyển
- <400> 2
 tcattgctga tccatgtaga tttcccggaac tttagctcaa aatgcatgta tttattagcg 60
- <210> 3
- <211> 1300
- <212> ADN
- <213> Trình tự nhân tạo
- <220>
- <223> Phân tử ADN khảm của ADN hệ gen của cây đậu tương và ADN gen chuyển
- <400> 3
 gtacaaataa aactttatct gtacatttcg ttagttaaata tatattttgt ccatcaaatt 60

gttccttttaa attaaaaatct aaaaaactaac tttaccgtaa agaaatatgc attcatgtat 120
 accaaataaaa attttgacaa gagtttaagt tttatattat gattcttaag gaaatcatta 180
 tcattataat ttataaaaaat aaataaattg ataattatat gctatatcaa tttatgattt 240
 gatgagtatg tatgttttaa atgcgagatt ctgccgccgt tcgatatagt tagcagtaga 300
 gccctgttct caccctcaca cctgctcagt gtgaacttta aaagggactt tgttgacaaa 360
 tgttaggattc gtcgtcttct tttgcaataa aaaattttca tctgtttaaa acgtttttat 420
 agtaaaatta taaatagaaa atttagttgt aaaatttgaa atataaattt aattagaatg 480
 cattcacatt gtaattcttt tacattatta tttattacct aattataaat tatcaacaat 540
 aaaatctgac atagtatatg tttagattaa aatttgtaaa tgtaagtttg aattaaaaaa 600
 gtatattata aacttgagtt tgggtataata ttttttatca tcagactttg gtataaatg 660
 agttgatcta aaagtaagtt gaaggatacc aaagggtaat ctaaaccatgc atgagaaatg 720
 ttggggaata tcttttagtgt aaacaaaaag cttataaat tatcatgtca tactatatat 780
 gacaaatggtt gggtttttgta ataatcattt taaatatgaa caacaggatt ttctttttac 840
 cgtcaaaaata tgaataaaaag ttaaactctt aaattattga tcataggttt gcaatttttt 900
 tttatagaga ggtttgcaat ttctgagttc tcaataactg atgattaaat gcgcacgtt 960
 tgcacatgcg aaaataaatt taagaggtaa ctttgaagt ctcaccttca tgtccggggc 1020
 tgccaggaaa gcttagatct ccatgagcat ccacgagctt atccacgagc atccacgagc 1080
 ttatccgatt tgagcattga tctccatgag ccatttagtc tcaccttcaa aactgatag 1140
 tttaaactga aggcgggaaa cgacaatctg atcccatca agctagcttc tgcaggtcct 1200
 gctcgagcgg ccgcagatct tgagccaatc aaagaggagt gatgtagacc taaagcaata 1260
 atggagccat gacgtaaggg cttacgcca tacgaaataa 1300

<210> 4

<211> 1947

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN khảm của ADN hệ gen của cây đậu tương và ADN gen chuyển

<400> 4

atgtactttc attttataat aacgctgcgg acatctacat ttttgaattg aaaaaaatt 60
 ggtaattact ctttcttttt ctccatattg accatcatatc tcattgctga tccatgtaga 120
 tttcccgac tttagctcaa aatgcatgta tttattagcg ttctgtcttt togttaattt 180
 gttctcatca taatattgtg acaaaaatat agctaggaaa gctttccatg catattttgt 240
 aagcaatgaa gtatatagtg gatgcaatgt ctctatatat tcactagtcg agaaaattgc 300
 ggacagttct gagattgatt ggcttcatgg ccctacggtg catctattac cattgtcttt 360

gcattttgtca tacaaaaagg tggaccatat tcatgttatg taaaaacaaa caaatcagc 420
 cagtgcacat cttctgcaga atgtgtaggt taaccttatt acacttgatt aagttaagtg 480
 tcatgccatt agtttgagat tgaacttaaa atctttaatc aagatcttag atatggaaaa 540
 aattgtaatt ccattaaaga taataagatt tttggataga aattaattat caattttaca 600
 ttaataacat aataatttga agaaaaaaag taaggggtcat aatcatacta accagagtaa 660
 tttgacacgt gaaggggaca ctatgaaagc aaattacttt tggttcctaa aggttaggca 720
 agggaaagaa agaatttgca cttaattagc actattttca aaattattat gtttcttttc 780
 cttatcttgc ttaaaatttg cttattgtgt tattattatt attattgtta tgcatgatca 840
 attattcatc aaagatcgat ctccaacctg ccaggaaatc cgctgatttg tttgcttcca 900
 atgtgagaga tccaagatca gaattctgga aggtagtgtc gactaccaag gtagcaaaat 960
 aatgatattg gggaagggtga aaaatatgta gtactagtac ttctactaca aaatttcaaa 1020
 aagggttttg tgatttgtgc ataagaatct ttttgcattt gtctgtaagc ttgaaaatta 1080
 cacgtggcac aagtcacttg cagccaaaga acctttctgt gaccaattat gttccctgag 1140
 ctgaatagtg gttcttattc taatctcatc aatatctaata tactagtga atatactact 1200
 agactattgc agtgttatta atatcttaata gatagactat tgcagcagac agaaattaca 1260
 ggtattatta tatactaata tacaattctg cattttccac acttttcccc tgcccatgct 1320
 tccatgccac tgaagtctga aaccacattg gcagattttg ctatctagaa attaaataac 1380
 aatataagtt tgtatattta tatttcatat ttttttagta catttttatt ttgcacactc 1440
 tataattcca tgattccttg attatcgag aatgatgtga tatgcaaacc acgagttaga 1500
 accatcaaat caagcaaaga tatggatgga atgcctttaa tggaaagatt aattcaaagg 1560
 ggcagaaact ggtaattttt tcttcaactg aatgctatgc agtatgcagc agatctttca 1620
 tttacagaat atctgcaaaa ctttgtgttg gagatcttac ctattgaata atgatatagg 1680
 taaaataaag tatttaattt caccataact ttttaagatga tgttaaaatg atctatgcaa 1740
 ttcattgttg atcgaatatt aaagatgtca catctaata tactatgata aaaataaagt 1800
 ataatttctg atcttataag tcaaaataaa tcatgtaaat ataaattaat tctcttctta 1860
 taaattaatt ttatataatt aagatagatc caatgtgaac tctaagacca tgcatatata 1920
 aaaatcatta tcaagtgaat atgcaac 1947

<210> 5
 <211> 3003
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn chèn gen chuyển

<400> 5
tcaaactg atagtttaaa ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgatcccc atcaagctag 60
cttctgcagg tcctgctcga gcggccgcag atcttgagcc aatcaaagag gagtgatgta 120
gacctaaagc aataatggag ccatgacgta agggcttacg cccatacgaa ataattaaag 180
gctgatgtga cctgtcggtc tctcagaacc tttacttttt atgtttggcg tgtattttta 240
aatctccacg gcaatgacga tgtgacccaa cgagatcttg agccaatcaa agaggagtga 300
tgtagaccta aagcaataat ggagccatga cgtaagggct tacgcccata cgaaataatt 360
aaaggctgat gtgacctgtc ggtctctcag aacctttact ttttatattt ggcgtgtatt 420
tttaaatttc cacggcaatg acgatgtgac ctgtgcatcc gctttgccta taaataagtt 480
ttagtttgta ttgatcgaca cggtcgagaa gacacggcca taagcttgga tcctcgagaa 540
ttctcaacac aacatataca aaacaaacga atctcaagca atcaagcatt ctacttctat 600
tgcagcaatt taaatcattt cttttaaagc aaaagcaatt ttctgaaaat tttcaccatt 660
tacgaacgat agccatggct tctatgatat cctcttcgcg tgtgacaaca gtcagccgtg 720
cctctagggg gcaatccgcc gcaatggctc cattcggcgg cctcaaatec atgactggat 780
tcccagtgag gaaggccaac actgacatta cttccattac aagcaatggg ggaagagtaa 840
agtgcattga ggtgtggcct ccaattggaa agaagaagtt tgagactctt tcctatttgc 900
caccattgac gagagattcc cgggccatgg ccaccttcgt ccgcaatgcc tggatgtgg 960
cggcgtgcc cgaggaaactg tccgaaaagc cgctcggccg gacgattctc gacacaccgc 1020
tcgctgctta ccgccagccc gacggtgtgg tcgctggcgt gctcgacatc tgtccgcacc 1080
gcttcgcgcc gctgagcgac ggcacctctg tcaacggcca tctccaatgc ccctatcacg 1140
ggctggaatt cgatggcggc gggcagtgcg tccataaccc gcacggcaat ggcgccgcc 1200
cggcttcgct caacgtccgc tccttcccg tgggtggagcg cgacgcgctg atctggatct 1260
gtcccgccga tccggcgtg gccgatcctg gggcgatccc cgacttcggc tgccgcgtcg 1320
atcccgcta tcggaccgtc ggcggctatg ggcagtcga ctgcaactac aagctgctgg 1380
tcgacaacct gatggacctc ggccacgccc aatatgtcca tcgcgccaac gccagaccg 1440
acgccttcga ccggctggag cgcgaggtga tcgtcggcga cggtagata caggcgtga 1500
tgaagattcc cggcggcacg ccgagcgtgc tgatggccaa gttcctgcgc ggcgccaata 1560
ccccgctga cgcttgaac gacatccgct ggaacaaggc gagcgcgatg ctcaacttca 1620
tcgctgtggc gccggaaggc acccgaagg agcagagcat cactcgcgc ggtaccata 1680
tcctgacccc cgagacggag gcgagctgcc attatttctt cggctcctcg cgcaatttcg 1740
gcatcgacga tccggagatg gacggcgtgc tcgctgagct gcaggctcag gcgctggcca 1800
aggaggacaa ggtcgtcgtc gaggcgatcg agcgcgcgcg cgcctatgtc gaggcgaatg 1860

gcatccgccc ggcgatgctg tcgtgcgacg aagccgcagt ccgtgtcagc cgcgagatcg 1920
 agaagcttga gcagctcgaa gccgcctgaa ccggccttatg ctgcacgggc ggggcggggc 1980
 ggtttcgatc ggctcgctg tcccggcgat attctagagc tttcgttcgt atcatcggtt 2040
 tcgacaacgt tcgtcaagtt caatgcatca gtttcattgc gcacacacca gaatcctact 2100
 gagtttgagt attatggcat tgggaaaact gtttttcttg taccatttgt tgtgcttgta 2160
 atttactgtg ttttttattc ggttttcgct atcgaactgt gaaatggaaa tggatggaga 2220
 agagttaatg aatgatatgg tccttttgtt cattctcaaa ttaatattat ttgttttttc 2280
 tcttatttgt tgtgtgttga atttgaaatt ataagagata tgcaaacatt ttgttttgag 2340
 taaaaatgtg tcaaatcgct gcctctaatt accgaagtta atatgaggag taaaacactt 2400
 gtagttgtac cattatgctt attcactagg caacaaatat attttcagac ctagaaaagc 2460
 tgcaaatgtt actgaatata agtatgtcct cttgtgtttt agacatttat gaactttcct 2520
 ttatgtaatt ttccagaatc cttgtcagat tctaatacatt gctttataat tatagttata 2580
 ctcatggatt ttagtttgag tatgaaaata ttttttaatt cattttatga cttgccaaatt 2640
 gattgacaac atgcatcaat cgcggccgct ctagaactag tggatcccc cctttaaggg 2700
 ggctgcagga attcgatatc aagctttggc gcgcaaatac gtgaagtttc tcatctaagc 2760
 ccccatthtg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat ttccgaatta gaataatttg 2820
 tttattgctt tcgcctataa atacgacgga tcgtaatttg tcgttttatc aaaatgtact 2880
 ttcattttat aataacgctg cggacatcta catttttgaa ttgaaaaaaa attggtaatt 2940
 actctttctt tttctccata ttgaccatca tactcattgc tgatccatgt agatttcccg 3000
 gac 3003

<210> 6

<211> 5946

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Phân tử ADN khảm của ADN hệ gen của cây đậu tương và ADN gen chuyển

<400> 6

gtacaaataa aactttatct gtacatttcg ttagttaaat tatattttgt ccatcaaatt 60
 gttcctttta attaaaaatct aaaaactaac tttaccgtaa agaaatatgc attcatgtat 120
 accaaataaa attttgacaa gagtttaagt tttatattat gattcttaag gaaatcatta 180
 tcattataat ttataaaaaat aaataaattg ataattatat gctatatcaa tttatgattt 240
 gatgagtatg tatgttttaa atgacgagatt ctgccgccgt tcgatatagt tagcagtaga 300
 gccctgttct caccctcaca cctgctcagt gtgaacttta aaagggactt tgttgacaaa 360

tgtaggac	gtcgtcttct	tttgcaataa	aaaattttca	tctgtttaaa	acgtttttat	420
agtaaaatta	taaatagaaa	athtagttgt	aaaatttgaa	atataaattt	aattagaatg	480
cattcacatt	gtaattcttt	tacattatta	tttattacct	aattataaat	tatcaacaat	540
aaaatctgac	atagtatatg	tttagattaa	aatttgtaaa	tgtaagtttg	aattaaaaaa	600
gtatattata	aacttgagtt	tggtataata	ttttttatca	tcagactttg	gtataatatg	660
agttgatcta	aaagtaagtt	gaaggatacc	aaagggtaat	ctaaacatgc	atgagaaatg	720
ttggggaata	tcttttagtgt	aaacaaaaag	ccttataaat	tatcatgtca	tactatatat	780
gacaaatggt	ggtttttgta	ataatcattt	taaatatgaa	caacaggatt	ttctttttac	840
cgtcaaaaata	tgaataaaaag	ttaaactctt	aaattattga	tcataggttt	gcaatttttt	900
tttatagaga	ggtttgcaat	ttctgagttc	tcaataactg	atgattaaat	gcgcatcggt	960
tgcatgcatg	aaaataaatt	taagaggtaa	catttgaagt	ctcaccttca	tgtccggggc	1020
tgccaggaaa	gcttagatct	ccatgagcat	ccacgagctt	atccacgagc	atccacgagc	1080
ttatccgatt	tgagcattga	tctccatgag	ccatttagtc	tcaccttcaa	acactgatag	1140
tttaaactga	aggcgggaaa	cgacaatctg	atcccatca	agctagcttc	tgtaggtcct	1200
gctcgagcgg	ccgcagatct	tgagccaatc	aaagaggagt	gatgtagacc	taaagcaata	1260
atggagccat	gacgtaaggg	cttacgcca	tacgaaataa	ttaaaggctg	atgtgacctg	1320
tcggtctctc	agaaccttta	ctttttatgt	ttggcgtgta	tttttaaatt	tccacggcaa	1380
tgacgatgtg	acccaacgag	atcttgagcc	aatcaaagag	gagtgatgta	gacctaaagc	1440
aataatggag	ccatgacgta	agggttacg	cccatacgaa	ataattaaag	gctgatgtga	1500
cctgtcggtc	tctcagaacc	tttacttttt	atatttggcg	tgtattttta	aatttccacg	1560
gcaatgacga	tgtgacctgt	gcatccgctt	tgccataaaa	taagttttag	tttgtattga	1620
tcgacacggg	cgagaagaca	cggccataag	cttgatcct	cgagaattct	caacacaaca	1680
tatacaaaac	aaacgaatct	caagcaatca	agcattctac	ttctattgca	gcaatttaaa	1740
tcatttcttt	taaagcaaaa	gcaattttct	gaaaattttc	accatttacg	aacgatagcc	1800
atggcttcta	tgatatactc	ttccgctgtg	acaacagtca	gccgtgcctc	tagggggcaa	1860
tccgccgcaa	tggctccatt	cggcggcctc	aatccatga	ctggattccc	agtgaggaag	1920
gtcaacactg	acattacttc	cattacaagc	aatggtggaa	gagtaaagtg	catgcaggtg	1980
tggcctccaa	ttggaaagaa	gaagtttgag	actctttcct	atgtgccacc	attgacgaga	2040
gattcccggg	ccatggccac	cttcgtccgc	aatgcctggg	atgtggcggc	gctgcccgag	2100
gaactgtccg	aaaagccgct	cggccggacg	attctcgaca	caccgctcgc	gctctaccgc	2160
cagccccgacg	gtgtggtcgc	ggcgtgctc	gacatctgtc	cgcaccgctt	cgcgccgctg	2220
agcgacggca	tcctcgtcaa	cggccatctc	caatgccctt	atcacgggct	ggaattcgat	2280

ggcggcgggc agtgcgcca taacccgcac ggcaatggcg cccgcccggc ttcgctcaac	2340
gtccgctcct tcccggtggt ggagcgcgac gcgctgatct ggatctgtcc cggcgatccg	2400
gcgctggccg atcctggggc gatccccgac ttcggctgcc gcgtcgatcc cgcctatcgg	2460
accgtcggcg gctatgggca tgtcgactgc aactacaagc tgctggtcga caacctgatg	2520
gacctcggcc acgcccata tgtccatcgc gccaacgccc agaccgacgc cttcgaccgg	2580
ctggagcgcg aggtgatcgt cggcgacggt gagatacagg cgctgatgaa gattcccggc	2640
ggcacgccga gcgtgctgat ggccaagtgc ctgcgcggcg ccaatacccc cgtcgacgct	2700
tggaaacgaca tccgctggaa caaggtagc gcgatgctca acttcacgc ggtggcgccg	2760
gaaggcaccc cgaaggagca gagcatccac tcgcgcggta cccatattct gacccccgag	2820
acggaggcga gctgccatta tttcttcggc tcctcgcgca atttcggcat cgacgatccg	2880
gagatggacg gcgtgctgcg cagctggcag gctcaggcgc tggtaagga ggacaaggtc	2940
gtcgtcgagg cgatcgagcg ccgccgcgcc tatgtcgagg cgaatggcat ccgccggcg	3000
atgctgtcgt gcgacgaagc cgcagtcctg gtcagccgcg agatcgagaa gcttgagcag	3060
ctcgaagccg cctgaaccgg cttatgctgc acgggcgggg cggggcggtt tcgatcggct	3120
cgcctgtccc ggcgatattc tagagctttc gttcgtatca tcggtttcga caacgttcgt	3180
caagttcaat gcatcagttt cattgcgcac acaccagaat cctactgagt ttgagtatta	3240
tggcattggg aaaactgttt ttcttgtagc atttggtgtg cttgtaattt actgtgtttt	3300
ttattcgggtt ttcgctatcg aactgtgaaa tggaaatgga tggagaagag ttaatgaatg	3360
atatggtcct tttgttcatt ctcaaattaa tattatttgt tttttctctt atttggtgtg	3420
tgttgaattt gaaattataa gagatatgca aacattttgt tttgagtaaa aatgtgtcaa	3480
atcgtggcct ctaatgaccg aagttaatat gaggagtaaa acacttgtag ttgtaccatt	3540
atgcttattc actaggcaac aaatatattt tcagacctag aaaagctgca aatgttactg	3600
aatacaagta tgcctcttg tgttttagac atttatgaac tttcctttat gtaattttcc	3660
agaatccttg tcagattcta atcattgctt tataattata gttatactca tggatttgta	3720
gttgagtatg aaaatatattt ttaatgcatt ttatgacttg ccaattgatt gacaacatgc	3780
atcaatcgcg gccgctctag aactagtgga tccccccctt taagggggct gcaggaattc	3840
gatatcaagc tttggcgcg caaatcgtga agtttctcat ctaagcccc atttgacgt	3900
gaatgtagac acgtcgaaat aaagatttcc gaattagaat aatttgttta ttgctttcgc	3960
ctataaatac gacggatcgt aatttgctgt tttatcaaaa tgtactttca ttttataata	4020
acgctgcgga catctacatt tttgaattga aaaaaattg gtaattactc tttctttttc	4080
tccatattga ccatcact cattgctgat ccatgtagat tccccggact ttagctcaaa	4140

atgcatgtat ttattagcgt tctgtctttt cgtaaatttg ttctcatcat aatattgtga	4200
caaaaaatata gctaggaaag ctttccatgc atatttttgta agcaatgaag tatatagtgg	4260
atgcaatgtc tctatatatt cactagtcga gaaaattgcg gacagttctg agattgattg	4320
gcttcatggc cctacgggtg atctattacc attgtctttg catttgatcat aaaaaagggt	4380
ggaccatatt catgttatgt aaaaacaaac aaaatcacgc agtgcacatc ttctgcagaa	4440
tgtgtaggtt aaccttatta cacttgatta agttaagtgt catgccatta gtttgagatt	4500
gaacttaaaa tctttaatca agatcttaga tatggaaaaa attgtaattc cattaaagat	4560
aataagattt ttggatagaa attaattatc aattttacat taataacata ataatttgaa	4620
gaaaaaaaagt aagggtcata atcatactaa ccagagtaat ttgacacgtg aaggggacac	4680
tatgaaagca aattactttt ggttcctaaa ggtaggcaa gggaaagaaa gaatttgcac	4740
ttaattagca ctattttcaa aattattatg tttcttttcc ttatcttgct taaaatttgc	4800
ttattgtgtt attattatta ttattgttat gcatgatcaa ttattcatca aagatcgatc	4860
tccaacctgc caggaaatcc gctgatttgt ttgcttccaa tgtgagagat ccaagatcag	4920
aattctggaa ggtagtgctg actaccaagg tagcaaaata atgatattgg ggaagggtgaa	4980
aaatatgtag tactagtact tctactacaa aatttcacaaa agggttttgt gatttgtgca	5040
taagaatctt ttgcatcttg tctgtaagct tgaaaattac acgtggcaca agtcacttgc	5100
agccaaagaa cctttctgtg accaattatg ttccctgagc tgaatagtgg ttcttattct	5160
aatctcatca atatctaatt acctagttaa tatactacta gactattgca gtgttattaa	5220
tatcttaatg atagactatt gcagcagaca gaaattacag gtattattat atactaatat	5280
acaattctgc attttccaca cttttccctt gccatgctt ccatgccact gaagtctgaa	5340
accacattgg cagattttgc tatctagaaa ttaaataaca atataagttt gtatatttat	5400
atttcatatt ttttttagtac atttttatct tgcacactct ataattccat gattccttga	5460
ttatcggaga atgatgtgat atgcaaacca cgagttagaa ccatcaaatc aagcaaagat	5520
atggatggaa tgcctttaat ggaaagatta attcaaaggg gcagaaactg gtaatttttt	5580
cttcaactga atgctatgca gtatgcagca gatctttcat ttacagaata tctgcaaaac	5640
cttgtgttgg agatcttacc tattgaataa tgatataggt aaaataaagt atttaatttc	5700
accataactt ttaagatgat gttaaaatga tctatgcaat tcatgttgga tcgaatatta	5760
aagatgtcac atctaagat actatgataa aaataaagta taatttctga tcttataagt	5820
caaaataaat catgtaaata taaattaatt ctcttcttat aaattaattt tatataatta	5880
agatagatcc aatgtgaact ctaagaccat gcataatataa aaatcattat caagtgaata	5940
tgcaac	5946

<210> 7
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Phân tử ADN khảm của ADN hệ gen của cây đậu tương và ADN gen chuyển

<400> 7
 gagcttatcc gatttgagca ttgatctcca tgagccattt agtctcacct tcaaacactg 60
 atagttaaata ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgatcccc 100

<210> 8
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Phân tử ADN khảm của ADN hệ gen của cây đậu tương và ADN gen chuyển

<400> 8
 ctccatattg accatcatac tcattgctga tccatgtaga tttcccggac tttagctcaa 60
 aatgcatgta tttattagcg ttctgtcttt tcgttaattt 100

<210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 9
 ttttctccat attgaccatc atactca 27

<210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 10
 agacagaacg ctaataaata catgcatt 28

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

<400> 11
 ttcccggact ttagctca 18

<210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

 <400> 12
 gatttcccgg acttttagctc aa 22

 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

 <400> 13
 tcacaatatatt atgatgagaa caaattaacg 30

 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

 <400> 14
 gcccctaatacg gattttttaac ttttc 25

 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

 <400> 15
 atgcatgtat ttattagcgt tc 22

 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Mỗi PCR oligonucleotit được tổng hợp hóa học

 <400> 16
 acatgtgtga ctacttct 18