



(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)   
**1-0020276**

(51)<sup>7</sup> **C07K 14/415, C12N 15/29, 15/63,**  
**15/82, 1/21, 5/14, A01H 3/00**

(13) **B**

(21) 1-2012-00726

(22) 08.07.2010

(86) PCT/CN2010/001015 08.07.2010

(87) WO2011/022930A1 03.03.2011

(30) 200910091728.9 24.08.2009 CN

(45) 25.01.2019 370

(43) 25.09.2012 294

(73) **INSTITUTE OF SUBTROPICAL AGRICULTURE, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES (CN)**

1071 Yuan Da Er Lu, Furong District Changsha, Hunan 410125, China

(72) **XIA, Xinjie (CN)**

(74) **Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)**

(54) **PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG TRỌNG LƯỢNG HẠT CỦA CÂY TRỒNG**

(57) Sáng chế đề cập đến protein OsXCL liên quan đến kiểu hình hình dạng hạt và hình dạng lá của lúa gạo, protein dẫn xuất và gen mã hóa chúng. Lúa chuyển gen biểu hiện quá mức gen OsXCL có kiểu hình là có sự gia tăng chiều dài hạt, trọng lượng hạt và số lượng hạt trên một chùy, và lá xoắn và các đặc điểm khác. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp thu được cây chuyển gen bằng cách biến nạp gen mã hóa protein OsXCL hoặc protein dẫn xuất của chúng vào cây trồng.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng trọng lượng hạt bằng cách đưa gen vào trong mục tiêu đích.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Lúa gạo là một trong những loại ngũ cốc chính trong chế độ dinh dưỡng của con người, là một loại thực phẩm thiết yếu cho gần một nửa dân số thế giới. Tại Trung Quốc, gạo chiếm vị trí đầu tiên trong tất cả các loại ngũ cốc về sản lượng và chiếm 60% lượng ngũ cốc được tiêu thụ của Trung Quốc; gần một nửa số nông dân sản xuất lúa gạo. Do đó, lúa gạo là một loại ngũ cốc chính trong thức ăn ngũ cốc của Trung Quốc. Cùng với mức độ gia tăng của dân số toàn cầu (tốc độ tăng trưởng dân số của các nước sử dụng lúa gạo nhanh hơn so với tốc độ tăng trưởng trung bình của dân số thế giới) và sự phát triển nhanh chóng của quá trình công nghiệp hóa và đô thị hóa cũng như sự tàn phá của thảm họa thiên nhiên và các yếu tố tương tự, diện tích đất trồng lúa đang có xu hướng giảm, gây ra mâu thuẫn cấp bách giữa cung và cầu lúa gạo trên toàn cầu. Làm thế nào để tạo ra nhiều thực phẩm trên ngày càng ít cánh đồng lúa cũng như đảm bảo sự cung cấp lúa gạo an toàn? Đây là một vấn đề cấp bách mà chúng ta đang phải đối mặt và khắc phục. Tuy nhiên, năng suất lúa gạo trong quá trình sản xuất quy mô lớn thường là rất thấp. Theo một khảo sát được tiến hành bởi Tổ chức nông nghiệp và lương thực của Liên hợp quốc (FAO) vào năm 1999, sản lượng gạo trung bình trên một đơn vị diện tích chỉ là 3,8 t/ha-1 (6,3 t/ha-1 ở Trung Quốc). Để khắc phục vấn đề này, Trung Quốc đã thực hiện dự án trồng lúa với năng suất cực cao (dự án trồng lúa siêu năng suất) trong 30 năm qua để phát triển tiềm năng năng suất của các giống lúa cho năng suất cao và nhờ đó, cải thiện đáng kể sản lượng lúa gạo. Trọng lượng hạt và số lượng hạt trên một chùy là các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình sản xuất ngũ cốc, và gia tăng kích thước hạt, trọng lượng hạt hoặc số lượng hạt trên một chùy là một phương pháp hiệu quả để cải thiện năng suất lúa gạo. Hơn nữa, chiều dài của hạt là một đặc điểm hình thái quan trọng quyết định chất lượng của gạo. Đối với các nhà sinh học và nông học, đây là mục tiêu đáng theo đuổi nhất để gia tăng cả sản lượng và chất lượng của gạo.

Đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2004/0123343 bộc lộ các polynucleotit hữu dụng để cải thiện các cây trồng. Các cây trồng chuyển gen thể hiện các tính chất được cải thiện, như tính chịu lạnh của cây trồng được làm tăng lên, tốc độ tăng trưởng, tính chịu hạn của cây tăng lên, tính chịu bệnh của cây tăng lên, sự sản sinh galactomannan, sự sản sinh các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, tính chống chịu của cây trồng đối với các thuốc diệt cỏ và các điều kiện siêu thẩm thấu tăng lên và nâng cao sự sử dụng nitơ và/hoặc hấp thụ phospho.

Đơn yêu cầu cấp patent Nhật Bản số JP 2005/185101 bộc lộ các dòng cADN có độ dài đầy đủ của các cây trồng và việc sử dụng chúng. Các cây trồng nguồn được ưu tiên là các cây ra hoa. Cơ sở dữ liệu vào Uniport: Q6Z610, EMBL: AP004799 và EMBL: AP004997 bộc lộ các trình tự SEQ ID NO: 1 và 2 giống nhau như được xác định ở đây.

Cả hai đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2004/0123343 và Nhật Bản số JP 2005/185101 bộc lộ các protein là giống với SEQ ID NO: 2 như được bộc lộ ở đây.

Đơn yêu cầu cấp patent Trung Quốc số CN 101161675 bộc lộ gen hạt lớn của cây lúa GW2 và việc ứng dụng của nó. Gen GW2 có thể được sử dụng để kiểm soát kích cỡ hạt của cây trồng, nâng cao hiệu suất hoặc chất lượng của cây trồng, điều chỉnh thời gian chu trình của sự phân bào có tơ của tế bào, và được sử dụng làm chất chỉ thị phân tử - để nhận diện các loại cây trồng là loại hạt lớn hoặc là loại hạt nhỏ.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp để làm tăng trọng lượng hạt của cây trồng bởi protein thu được từ lúa gạo, được gọi là OsXCL, trong cây đích chuyển gen, nó là protein sau đây:

Protein bao gồm trình tự axit amin như được thể hiện bởi SEQ ID NO. 2 trong phần Danh mục trình tự;

SEQ ID NO. 2 là trình tự axit amin của OsXCL bao gồm 255 axit amin, trong đó có 72 axit amin kỵ nước (bao gồm cả prolin), 183 axit amin ưa nước, 34 axit amin có tính axit và 38 axit amin có tính bazơ. Protein có trọng lượng phân tử là 26,73kda và điểm đẳng điện là 9,8. Đây là một protein mới chưa được báo cáo.

Tag như được nêu trong bảng 1 có thể được liên kết với đầu amin hoặc đầu carboxyl của protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO. 2

trong phần Danh mục trình tự để thuận tiện cho quá trình tinh chế protein OsXCL thuộc loại 1).

Bảng 1: Trình tự của tag

| Tag          | Gốc                | Trình tự   |
|--------------|--------------------|------------|
| Poly-Arg     | 5-6 (thường là 5)  | RRRRR      |
| Poly-His     | 2-10 (thường là 6) | HHHHHH     |
| FLAG         | 8                  | DYKDDDDK   |
| Strep-tag II | 8                  | WSHPQFEK   |
| c-myc        | 10                 | EQKLISEEDL |

Protein OsXCL thuộc loại 2) nêu trên có thể thu được bằng phương pháp tổng hợp nhân tạo, hoặc có thể thu được bằng cách tổng hợp gen mã hóa chúng trước khi biểu hiện sinh học. Gen mã hóa protein OsXCL thuộc loại 2) nêu trên có thể thu được bằng xử lý trình tự ADN như được thể hiện bởi các bazơ từ vị trí 106 đến 870 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1 trong phần Danh mục trình tự bằng cách loại bỏ các mã bộ ba của một hoặc nhiều gốc axit amin, và/hoặc gây đột biến nhằm mã bộ ba (missense mutation) một hoặc nhiều cặp bazơ, và/hoặc gắn trình tự mã hóa một tag như được nêu trong bảng 1 ở đầu 5' và/hoặc đầu 3' của trình tự ADN nói trên.

Gen mã hóa của protein trên, được gọi là *OsXCL*, được đưa vào trong cây trồng đích theo sáng chế.

Gen mã hóa gen là các gen thuộc loại 1) hoặc 2) hoặc 3) hoặc 4) sau đây:

- 1) gen có trình tự mã hóa như được thể hiện bởi vị trí 106 đến 870 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1 trong phần Danh mục trình tự;
- 2) gen có trình tự mã hóa như được thể hiện bởi vị trí 50 đến 873 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1 trong phần Danh mục trình tự;
- 3) gen lai với gen thuộc loại 1) hoặc 2) ở các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao và mã hóa protein nói trên;
- 4) gen có độ tương đồng 80%, hoặc hơn 80% so với gen thuộc loại 1) hoặc 2) và mã hóa protein nói trên.

SEQ ID NO. 1 là ADN bổ trợ nguyên vẹn mã hóa OsXCL bao gồm 1062 bazơ,

trong đó, vùng 5' không dịch mã bao gồm 105 bazơ, vùng 3' không dịch mã bao gồm 192 bazơ, và vùng mã hóa bao gồm 765 bazơ (từ vị trí 106 đến vị trí 870), mã hóa protein OsXCL có trình tự axit amin SEQ ID NO. 2 trong phần Danh mục trình tự. Trong vùng mã hóa, A chiếm 15,16% (116), C chiếm 40,65% (311), G chiếm 32,29% (247), T chiếm 11,9% (91), A+T chiếm 27,06% (207), và C+G chiếm 72,94% (558).

Điều kiện có tính nghiêm ngặt cao là: đặt màng lai trong dung dịch tiền lai (dung dịch đệm natri phosphat 0,25mol/l, pH=7,2, SDS 7%) để lai sơ bộ ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 30 phút; loại bỏ dung dịch tiền lai, và thêm dung dịch lai (dung dịch đệm natri phosphat 0,25mol/l, pH=7,2, SDS 7%, đoạn nucleotit được đánh dấu đồng vị) để lai ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 12 giờ; loại bỏ dung dịch lai, và thêm dung dịch làm trong màng I (dung dịch đệm natri phosphat 20mmol/l, pH=7,2, SDS 5%), rửa màng ở nhiệt độ 65°C hai lần, mỗi lần kéo dài trong thời gian 30 phút; thêm dung dịch làm trong màng II (dung dịch đệm natri phosphat 20mmol/l, pH=7,2, SDS 1%), rửa màng ở nhiệt độ 65°C trong thời gian 30 phút.

Cặp mồi được sử dụng để khuếch đại gen *OsXCL* nguyên vẹn nêu trên hoặc một đoạn bất kỳ của nó cũng được bộc lộ.

Dòng tế bào chuyển gen chứa gen nêu trên cũng được bộc lộ.

Chủng tái tổ hợp chứa gen nêu trên cũng được bộc lộ.

Vector tái tổ hợp chứa gen nêu trên cũng được bộc lộ.

Vector biểu hiện tái tổ hợp chứa gen *OsXCL* có thể được tạo cấu trúc bằng vector biểu hiện ở thực vật đã có. Vector biểu hiện ở thực vật bao gồm vector *Agrobacterium* bậc hai và vector có thể được sử dụng trong phương pháp bắn gen ở thực vật và các phương pháp tương tự, như pCAMBIA3301, pCAMBIA1300, pBI121, pBin19, pCAMBIA2301, pCAMBIA1301-UbiN, pBY505 hoặc các vector biểu hiện thu được ở thực vật khác. Khi tạo cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp với gen *OsXCL*, có thể sử dụng đoạn khởi đầu tăng cường, đoạn khởi đầu liên tục, đoạn khởi đầu đặc hiệu mô hoặc đoạn khởi đầu có thể kích thích được bất kỳ một cách riêng biệt hoặc cùng với các đoạn khởi đầu ở thực vật khác, như đoạn khởi đầu 35S của virus khảm súp lơ (CAMV), đoạn khởi đầu gen ubiquitin (pUbi), đoạn khởi đầu Actin và các yếu tố tương tự trước khi tiến hành phiên mã nucleotit của gen nói trên.

Ngoài ra, khi tạo cấu trúc vector biểu hiện ở thực vật với gen theo sáng chế, có

thể sử dụng yếu tố tăng cường bao gồm yếu tố tăng cường dịch mã và yếu tố tăng cường phiên mã. Các trình tự tăng cường này có thể là mã bộ ba khởi đầu ATG hoặc mã bộ ba khởi đầu của các trình tự liên kề và các trình tự tương tự, cần phải giống trình tự mã hóa về khung đọc để đảm bảo việc dịch mã chính xác toàn bộ trình tự. Có rất nhiều nguồn tín hiệu điều hòa dịch mã và mã bộ ba khởi đầu, có thể có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp. Trình tự khởi đầu dịch mã có thể là trình tự khởi đầu phiên mã hoặc một gen cấu trúc.

Vectơ biểu hiện ở thực vật cần sử dụng có thể được xử lý, chẳng hạn, bằng cách đưa gen cần biểu hiện trong thực vật để tạo ra enzym có khả năng thay đổi màu sắc hoặc hợp chất phát sáng (gen GUS, gen GFP, gen luxiferaza v.v.), chỉ thị kháng kháng sinh (chỉ thị gentamixin, chỉ thị kanamycin v.v.) hoặc gen chỉ thị hoạt chất kháng hóa chất (chẳng hạn, gen kháng thuốc diệt cỏ) và các chỉ thị tương tự, để thuận tiện trong quá trình xác định và sàng lọc tế bào hoặc cây chuyển gen.

Cụ thể, vectơ tái tổ hợp nêu trên có thể là vectơ tái tổ hợp thu được bằng cách xen gen nói trên vào vị trí đa tách dòng của vectơ biểu hiện 163-1300;

trong đó, phương pháp tạo cấu trúc vectơ biểu hiện 163-1300 bao gồm bước nối bằng ADN chứa đoạn khởi đầu kép 35S được tạo ra bằng cách cắt pJIT163 bằng enzym KpnI và XhoI với một đoạn lớn được tạo ra bằng cách cắt pCAMBIA1300 bằng enzym KpnI và SalI để tạo ra vectơ biểu hiện tái tổ hợp.

Mục đích của sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng trọng lượng hạt của cây chuyển gen. Phương pháp làm tăng trọng lượng hạt của cây chuyển gen bao gồm bước đưa gen nói trên vào cây trồng đích để tạo ra cây chuyển gen có trọng lượng hạt lớn hơn trọng lượng hạt của cây trồng đích.

Cũng được bộc lộ trong sáng chế là phương pháp làm tăng chiều dài hạt của cây chuyển gen. Phương pháp làm tăng chiều dài hạt của cây chuyển gen bao gồm bước đưa gen nêu trên vào cây đích để tạo ra cây chuyển gen có chiều dài hạt dài hơn chiều dài hạt của cây đích.

Cũng được bộc lộ trong sáng chế là phương pháp làm tăng số lượng hạt trên một chùy của cây chuyển gen. Phương pháp làm tăng số lượng hạt trên một chùy của cây chuyển gen bao gồm bước đưa gen nêu trên vào cây đích để tạo ra cây chuyển gen có số lượng hạt trên một chùy lớn hơn so với số lượng hạt trên một chùy của cây đích.

Cũng được bộc lộ trong sáng chế là phương pháp tạo cây chuyển gen có lá xoắn. Phương pháp tạo cây chuyển gen có lá xoắn bao gồm bước đưa gen nêu trên vào cây đích để tạo ra cây chuyển gen có lá xoắn.

Gen nêu trên được đưa vào thực vật đích nhờ vector tái tổ hợp nêu trên. Vector biểu hiện ở thực vật mang gen *OsXCL* có thể được biến nạp vào tế bào thực vật hoặc mô thực vật nhờ plasmid Ti, plasmid Ri, vector virus thực vật, các phương pháp sinh học thường quy, như phương pháp bắn gen, đưa gen qua con đường ống hạt phấn, vi biến nạp, biến nạp điện, biến nạp qua *Agrobacterium* và các phương pháp tương tự.

Cây trồng nói trên có thể là cây trồng hai lá mầm hoặc cây trồng một lá mầm; cây trồng một lá mầm được ưu tiên là lúa gạo, và cây trồng hai lá mầm có thể là *Arabidopsis thaliana*.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả của phân tích điện di trên gel agarosa ADN bổ trợ *OsXCL* được khuếch đại bằng PCR, trong đó, đường 1 là chỉ thị ADN; đường 2 và 3 là ADN bổ trợ *OsXCL*.

Fig.2 là hình vẽ khẳng định quá trình cắt bằng enzym *HindIII* và *EcoRI* sau khi nối *OsXCL* vào vector T, trong đó, đường 1 là chỉ thị ADN; đường 2 đến 5 là kết quả cắt bằng enzym *EcoRI* và *HindIII* vector tách dòng ADN bổ trợ *OsXCL*.

Fig.3 là hình vẽ khẳng định quá trình cắt bằng enzym *BamHI* sau khi nối ADN bổ trợ *OsXCL* vào vector T; P1, P2, P3 và P4 là các băng của plasmid ADN bổ trợ *OsXCL* trước khi cắt bằng enzym *BamHI*; 1, 2, 3 và 4 là các băng của plasmid ADN bổ trợ *OsXCL* sau khi cắt bằng enzym *BamHI*, M là chỉ thị ADN.

Fig.4 là bản đồ của pJIT163.

Fig.5 là bản đồ của pCAMBIA1300.

Fig.6 là một phần của bản đồ của vector pMD18-T chứa *OsXCL*.

Fig.7 là hình vẽ khẳng định quá trình cắt bằng enzym *EcoRI* sau khi nối *OsXCL* vào vector biểu hiện; đường 1 đến 5 là kết quả cắt vector biểu hiện bằng enzym *EcoRI* *OsXCL*.

Fig.8 là hình vẽ khẳng định quá trình cắt bằng enzym *HindIII* sau khi nối *OsXCL* vào vector biểu hiện; đường 1 đến 5 là kết quả cắt vector biểu hiện *OsXCL* bằng

enzym *HindIII*.

Fig.9 là hình vẽ khẳng định quá trình cắt bằng enzym *EcoRI* và *HindIII* riêng biệt được tiến hành lần lượt trên plasmid được phân lập từ *Agrobacterium*; đường 1, chỉ thị ADN; đường 2, kết quả của plasmid vector biểu hiện *OsXCL* sau khi cắt bằng enzym *EcoRI*; đường 3, kết quả của plasmid vector biểu hiện *OsXCL* sau khi cắt bằng enzym *HindIII*.

Fig.10 là hình vẽ khẳng định kết quả của phản ứng PCR được tiến hành với mẫu được thiết kế theo gen kháng hygromycin. Trong đó, M là chỉ thị ADN; đường 1 đến 9 và 12 đến 21, kết quả PCR của gen kháng hygromycin được tiến hành với ADN hệ gen của lúa chuyển gen *OsXCL* là khuôn; đường 10 và 22, gen kháng hygromycin được khuếch đại bằng plasmid vector biểu hiện là khuôn được sử dụng là đối chứng dương; đường 11 và 23, đối chứng âm không có khuôn (nước).

Fig.11 là phân tích quá trình biểu hiện tương đối của phản ứng PCR thời gian thực định lượng được tiến hành trên thực vật T0 93-11 được biến nạp gen *OsXCL*. S1, lúa đối chứng không chuyển gen; S2, lúa đối chứng với vector trống không có gen *OsXCL*; S3-S25, lúa T0 93-11 chuyển gen *OsXCL*.

Fig.12 là hình ảnh về hạt của lúa chuyển gen *OsXCL* và hạt của cây lúa đối chứng.

Fig.13 là hình ảnh của cây lúa thế hệ T0 chuyển gen *OsXCL* với lá xoắn và lúa thế hệ T2 với gốc lá thẳng bị xoắn ở giai đoạn muộng.

Fig.14 là hình ảnh thể hiện số lượng hạt trên một chùy được gia tăng của thế hệ T2 của lúa chuyển gen 9311 biểu hiện quá mức gen *OsXCL*.

Fig.15 là biểu đồ thể hiện quá trình sinh trưởng của hạt của lúa chuyển gen 9311 biểu hiện quá mức gen *OsXCL*.

Fig.16 hình ảnh thể hiện *Arabidopsis thaliana* biểu hiện quá mức gen *OsXCL* có số lượng quả được gia tăng và lá xoắn.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn khi tham khảo phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, tuy nhiên, các ví dụ sau đây sẽ không hạn chế phạm vi bảo hộ của sáng chế.



Mỗi phương pháp trong phần ví dụ thực hiện sáng chế sau đây đều là những phương pháp thường quy, trừ khi có quy định khác.

Ví dụ 1: tạo lúa chuyển gen có nhiều hạt lớn và dài và lá xoắn

## I. Tạo cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp

### 1. Tách dòng gen *OsXCL*

Một cặp môi được tổng hợp nhân tạo có đầu 5' được thêm lần lượt các vị trí cắt của enzym *NcoI* và *BamHI*. Môi xuôi và môi ngược có trình tự như sau:

F: 5- **CCATG**GGAATCCAATCCACTCCACTCCACC-3 (30);

R: 5- **GGATCC** CTAATAGGCGGTGTGGTGTGCG -3 (29).

ARN, được tách chiết từ lúa Pei'ai 64S (Chinese National Center for Rice Hybridization and Breeding, Changsha, China), được phiên mã ngược để tạo ra sợi thứ nhất của ADN bổ trợ.

PCR được thực hiện để khuếch đại ADN bổ trợ như được thể hiện bởi SEQ ID NO: 1 với cặp môi xuôi và ngược nêu trên và ADN bổ trợ của lúa Pei'ai 64S làm khuôn. Phản ứng PCR bắt đầu với quá trình biến tính sơ bộ ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 5 phút dưới nắp bình phản ứng nóng ở nhiệt độ 105°C, sau đó là 32 chu kỳ biến tính ở nhiệt độ 94°C trong thời gian 30 giây, gắn môi ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 giây, kéo dài chuỗi ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 1 phút 20 giây, kết thúc bằng quá trình kéo dài chuỗi cuối cùng ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút, và nhiệt độ được duy trì ở nhiệt độ 22°C.

Hệ phản ứng PCR là như sau:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| ddH <sub>2</sub> O | 3,25µl |
| đệm 2×GC I         | 12,5µl |
| Môi-1(10µM)        | 2µl    |
| Môi -2(10µM)       | 2µl    |
| dNTP               | 4µl    |
| ADN bổ trợ khuôn   | 1µl    |
| LA Taqpolymeraza   | 0,25µl |
| Tổng thể tích      | 25µl   |

Phân tích điện di trên gel agarosa được thực hiện bằng đệm điện di TAE, và các

đoạn được tạo ra có kích thước khoảng 800bp (Fig.1) được gọi là *OsXCL*.

Các băng *OsXCL* nêu trên được thu lại bằng phương pháp cắt và chiết gel sử dụng bộ kit TIANGEN. Đoạn khôi phục được nối vào vector pMD18-T (TA Cloning, Jinan TaiTianHe Biotechnology Limited Company), và hệ nối là như sau:

|               |             |
|---------------|-------------|
| Trình tự xen  | 4,5 $\mu$ l |
| VectorT       | 0,5 $\mu$ l |
| Dung dịch I   | 5 $\mu$ l   |
| Tổng thể tích | 10 $\mu$ l  |

Quá trình nối kéo dài trong thời gian 2 giờ, và vector được biến nạp vào tế bào có hoạt lực *E.coli* DH5 $\alpha$ , tế bào cấy trải trên đĩa, và sàng lọc bằng ampicilin. Các thể tách dòng đơn được chọn, từ đó plasmid được phân lập và xác định bằng phương pháp cắt bằng hai enzym *Hind*III và *Eco*RI. Quá trình phân cắt bằng enzym chỉ ra sự có mặt của băng *OsXCL* có kích thước khoảng 800bp, như được thể hiện trên Fig.2.

Plasmid được cắt bằng *Bam*HI để xác định hướng theo đó đoạn *OsXCL* đích được nối vào vector T, và kết quả, như được thể hiện trên Fig.3, là: vì vị trí cắt của *Bam*HI được thêm vào mỗi xuôi, nên việc xen ngược dòng vào vector T sẽ tạo ra một băng có kích thước khoảng 840bp; trên Fig.3, P1, P2, P3 và P4 thể hiện plasmid chưa bị cắt, kích thước băng của các plasmid này được chỉ ra theo đơn vị 1kb cùng với chỉ thị ở bên phải, và 1, 2, 3 và 4 thể hiện kết quả sau khi cắt, kích thước băng được chỉ ra theo đơn vị 1kb cùng với chỉ thị ở bên trái. So sánh kết quả, có thể thấy rằng trừ plasmid 4, các plasmid 1, 2 và 3 đều được cắt mở, và đoạn trình tự đích được nối xuôi dòng (nghĩa là, mỗi đoạn khoảng 800bp). Dung dịch vi khuẩn tương ứng với plasmid 1, 2 và 3 được đọc trình tự, và kết quả đọc trình tự chỉ ra rằng đoạn *OsXCL* đích có trình tự là từ vị trí 50 đến 873 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO: 1, và ORF (khung đọc mở) của gen *OsXCL* có trình tự hoàn toàn giống với trình tự được thể hiện bởi các vị trí 106 đến 870 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO: 1.

## 2. Tạo cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp

### 1) Tạo cấu trúc vector biểu hiện 163-1300

pJIT163 (pGreen, <http://www.pgreen.ac.uk/>) như được thể hiện trên Fig.4 được cắt bằng enzym *Kpn*I và *Xho*I, và kết quả cắt bằng enzym được xác định thông qua điện di trên gel agarosa trước khi khôi phục bằng ADN chứa đoạn khởi đầu kép 35S.

Như được thể hiện trên Fig.5, pCAMBIA1300 (CambiaLabs, [http://www.cambia.org/daisy/bioforge\\_legacy/3725.html](http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3725.html)) được cắt bằng enzym KpnI và SalI, và các đoạn lớn được thu lại. XhoI và SalI là các isocaudarmer. Hai đoạn vừa thu lại được nối bằng T4 ligazaqua đêm để tạo ra vector phức 163-1300.

## 2) Tạo cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp

Vector T chứa *OsXCL*, như được thể hiện trên Fig.6, được cắt bằng các enzym *NcoI* và *BamHI* (nếu *BamHI* hoạt động trên vị trí cắt enzym được đưa vào ở vị trí 872 thông qua việc thiết kế mới hoặc vị trí cắt enzym trên vector T ở vị trí 887, đoạn được thu lại sẽ chứa mã bộ ba kết thúc của *OsXCL* ORF). Vector biểu hiện 163-1300 cũng được cắt bằng hai enzym này, được thu lại và sau đó được nối, nghĩa là, gen *OsXCL* được nối vào vector biểu hiện 163-1300, để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp, được gọi là *OsXCL*-163-1300, được khẳng định bằng cách cắt lần lượt bằng enzym *HindIII* và *EcoRI*. Như được thể hiện trên các Fig.7 và 8 (1, 2, 3, 4 và 5 là các băng của vector biểu hiện *OsXCL* sau khi cắt enzym), kết quả chỉ ra rằng 1, 3, 4 và 5 đều chứa băng đích chính xác có kích thước khoảng 1600bp chứa *OsXCL*.

## II. Tạo và phát hiện lúa chuyển gen có hạt dài và lá xoắn

### 1. Tạo lúa chuyển gencó nhiều hạt lớn và dài, và lá xoắn

Vector biểu hiện tái tổ hợp trong bước I.2 được sử dụng để biến nạp *Agrobacterium* EHA105 (được bán bởi Tiangen Biotech (Beijing) Co.,Ltd.) bằng phương pháp đông lạnh – giải lạnh để biến nạp *Agrobacterium*. Plasmid được phân lập từ *Agrobacterium* được tiến hành cắt lần lượt bằng enzym *EcoRI* và *HindIII* (Fig.9). Trong đó, các bước của phương pháp đông lạnh – giải lạnh để biến nạp *Agrobacterium* là như sau:

Tế bào *Agrobacterium* EHA105 có hoạt lực được bảo quản ở nhiệt độ -70°C được lấy ra và cho vào bể đá để giải lạnh; 10 đến 20µl ADN plasmid pCAMBIA1300-2×CaMV35S-*OsMsr1*-CaMV35S-Term (khoảng 1 đến 2µg) được thêm vào 200ml tế bào *Agrobacterium* hoạt lực đã giải lạnh được khuấy bằng đầu côn vô trùng, và để yên trong vài phút; hỗn hợp được cho vào nitor lỏng trong thời gian 1 phút, và cho vào trong bể nước ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 5 phút, sau đó, 700 đến 800µl môi trường LB lỏng được thêm vào, sau đó là lắc ở nhiệt độ 28°C ở tốc độ 200 vòng/phút trong thời gian 4 giờ; ly tâm ở tốc độ 1000 vòng/phút trong thời gian 30 giây, một

phần của dịch nổi sau ly tâm được loại bỏ, giữ lại 100 đến 150 $\mu$ l, phần giữ lại này được tái phân tán bằng cách hút và phun bằng đầu côn, và trải trên đĩa LB chứa Kanamycin 50mg/l, Rifampicin 50mg/l và clomoxetin 34mg/l; sau đó đĩa được lật ngược lại và nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong thời gian 2 ngày.

*Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp được xác nhận nêu trên được sử dụng để lây nhiễm mô sẹo của lúa 93-11 (Chinese National Center for Rice Hybridization and Breeding, Changsha, China) bằng phương pháp truyền nhiễm. Sau đó, mô sẹo đã lây nhiễm được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc chứa hygromycin (50mg/l) để tạo ra thực vật được tái sinh kháng hygromycin.

ADN hệ gen được tách chiết từ lá của cây kháng hygromycin, và được dùng là khuôn để thực hiện phản ứng PCR xác nhận với mồi được thiết kế dựa trên gen kháng hygromycin sau đây:

pC13-hyg-F: 5'- ACCTGCCTGAAACCGAACTG-3';

pC13-hyg-R: 5'-CTGCTCCATACAAGCCAACC-3'.

Kết quả xác nhận được thể hiện trên Fig.10, băng đích thu được ở các đường 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 15, 16, 18 và 20, tổng số 12 dòng thực vật, nghĩa là, tổng số có 12 cây dương tính ở thế hệ T0 của cây chuyển gen (gen hygromycin có liên quan gần với *OsXCL* đã được kết hợp vào hệ gen của lúa).

## 2. Phân tích phát hiện

Lúa chuyển gen *OsXCL* nêu trên được chuyển vào nhà kính để trồng, được bọc lại và tự thụ phấn, và hạt từ lúa chuyển gen được thu lại.

Trong khi đó, lúa chuyển gen vector biểu hiện 163-1300 không có gen *OsXCL* được sử dụng là đối chứng vector trống; và lúa không chuyển gen cũng được sử dụng làm đối chứng.

### 1) Phát hiện bằng PCR định lượng

Phản ứng PCR định lượng được thực hiện trên lúa chuyển gen *OsXCL* và lúa không chuyển gen với trình tự mồi ADN 108-F và 108-R của gen *OsXCL*; kết quả được thể hiện trên Fig.11, *OsXCL* có mức độ biểu hiện tương đối thấp ở lúa không chuyển gen 93-11, và mức độ biểu hiện được gia tăng đáng kể ở lúa chuyển gen *OsXCL*.

Trong đó, mỗi cho phản ứng RT-PCR là như sau:

108-F: 5'-CCGCCATCATCCAAACTGA-3' (Tm 59, PCR 56);

108-R: 5'-GGTGACCACGCCCTTCTTC-3' (Tm 59, PCR 56).

#### Hệ RT-PCR

| Hóa chất                     | Nồng độ | Thể tích (μl) | Thể tích (μl) | Nồng độ cuối cùng (μM) |
|------------------------------|---------|---------------|---------------|------------------------|
|                              |         | + RT          | -RT           |                        |
| Dung dịch phản ứng master 2× | 2×      | 5,0           | 5,0           | 1×                     |
| Hỗn hợp QuantutyTec RT       | 100×    | 0,1           | 0,0           |                        |
| Môi 108-F                    | 20,0 μM | 0,2           | 0,2           | 0,4                    |
| Môi 108-R                    | 20,0 μM | 0,2           | 0,2           | 0,4                    |
| Nước không chứa ARN          |         | 0,5           | 0,6           |                        |
| ARN khuôn                    | 5 ng/μl | 4,0           | 4,0           | 20 ng/phản ứng         |
| Tổng số                      |         | 10,0          | 10,0          |                        |

#### Số lượng chu kỳ PCR

48°C/30 phút, 1 chu kỳ

95°C/10 phút, 1 chu kỳ

95°C/15 giây, 56°C/1 phút, 40 chu kỳ

#### điều kiện đường cong nóng chảy

95°C/15 giây

60°C/20 giây

95°C/15 giây

#### 2) Quan sát kiểu hình và thống kê

A. Hạt từ cây T0 của lúa chuyển gen *OsXCL93-11*, đối chứng vector trống và lúa không chuyển gen 93-11 được xác định trọng lượng và đo trọng lượng của 100 hạt và chiều dài hạt, và cây T0 được quan sát và đếm số lượng cây có lá xoắn.

Thử nghiệm được nhắc lại 3 lần, và kết quả được thể hiện trên Fig.12 và trong bảng 2. So với lúa không chuyển gen 93-11 và đối chứng vector trống, lúa chuyển gen *OsXCL* có mức độ gia tăng đáng kể về trọng lượng của 100 hạt và chiều dài hạt. Trong đó, so với lúa kiểu dại, trọng lượng của 100 hạt của lúa chuyển gen *OsXCL* được gia tăng 25,1% tính theo trọng lượng tươi và 23% tính theo trọng lượng khô, chiều dài hạt được gia tăng 1/4, và mức độ hạt bạc bụng (chalky grain) được giảm đi (cải thiện chất lượng gạo).

Bảng2: Trọng lượng của 100 hạt và chiều dài hạt của lúa T0

|                                                      | Lúa chuyển gen<br><i>OsXCL</i> | Đối chứng vector<br>trống | Lúa không chuyển<br>gen |
|------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Chiều dài hạt (mm)                                   | 11,3833±0,08868                | 8,7027±0,08997            | 8,6167±0,07836          |
| Trọng lượng của 100<br>hạt<br>(trọng lượng tươi) (g) | 4,224±0,11                     | 3,401±0,08                | 3,377±0,10              |
| Trọng lượng của 100<br>hạt<br>(trọng lượng khô) (g)  | 3,36±0,09                      | 2,761±0,07                | 2,73±0,09               |

Chú ý: trọng lượng khô của hạt thu được bằng cách phơi hạt ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 ngày trước khi xác định trọng lượng.

So với lúa không chuyển gen và đối chứng vector trống, cây T0 của lúa chuyển gen *OsXCL* có lá rộng hơn một chút và lá xoắn một cách đáng kể (Fig.13). Cây có lá xoắn chiếm đến 90% số cây lúa chuyển gen *OsXCL*. Hiện tượng xoắn bắt đầu từ gốc lá và, ở giai đoạn muộn, phân trên của lá sẽ mở ra.

B. Số lượng hạt trên một chùy của cây T2 biểu hiện quá mức gen *OsXCL* và cây đối chứng được biến nạp vector pCAMBIA1300-163 trống được đếm, và số lượng cây T2 có lá xoắn được quan sát.

Thử nghiệm được lặp lại ba lần. Fig.14 và bảng 3 thể hiện số lượng hạt trên một chùy. So với đối chứng vector trống, lúa chuyển gen 9311 biểu hiện quá mức gen *OsXCL* có mức độ gia tăng số lượng hạt trên một chùy đáng kể.

Bảng 3: Mức độ gia tăng số lượng hạt trên một chùy của lúa chuyển gen 9311 biểu hiện quá mức gen *OsXCL*

|                                      | Chùy<br>-1 | Chùy<br>-2 | Chùy<br>-3 | Chùy<br>-4 | Chùy<br>-5 | Chùy<br>-6 | Chùy<br>-7 | Chùy<br>-8 | Chùy<br>-9 | Chùy<br>-10 | Tổng<br>số<br>lượng<br>hạt | Số lượng<br>hạt /chùy | %<br>gia<br>tăng |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| Lúa được biến nạp <i>OsXCL</i> 9311* | 213        | 183        | 215        | 268        | 191        | 234        | 188        | 258        | 244        | 261         | 2255                       | 225,5                 | 11,0             |
| Lúa được biến nạp vector             | 190        | 195        | 220        | 187        | 201        | 221        | 204        | 196        | 223        | 195         | 2032                       | 203,2                 |                  |

|               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| trống<br>9311 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

\* Dòng lúa chuyển gen C3-3

Fig.13 thể hiện kết quả mức độ xoắn lá. Gốc lá của lúa chuyển gen 9311 biểu hiện quá mức gen *OsXCL* bắt đầu xoắn ở giai đoạn muộn.

C. Ba mươi hạt được chọn từ cây T3 biểu hiện quá mức gen *OsXCL* và cây đối chứng được biến nạp vector pCAMBIA1300-163 trống, và được xác định chiều dài hạt.

Thử nghiệm được lặp lại 3 lần, và kết quả được thể hiện trên Fig.15. Cây đối chứng vector trống có chiều dài hạt trung bình là 8,62mm; cây biểu hiện quá mức gen *OsXCL* có chiều dài hạt là 11,38mm, dài hơn 24,30% so với chiều dài hạt của cây đối chứng được biến nạp vector trống.

Do đó, tất cả các dòng cây chuyển gen biểu hiện quá mức gen *OsXCL* đều có kiểu hình là chiều dài hạt và trọng lượng hạt được gia tăng từ thế hệ T0 đến T3.

Ví dụ 2: Tạo *Arabidopsis thaliana* chuyển gen

Vector biểu hiện tái tổ hợp *OsXCL*-163-1300 thu được theo phương ở Ví dụ 1, và sau đó được kết hợp vào hệ gen của *Arabidopsis thaliana* (Col-0, được bán bởi Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC) bằng phương pháp floral-dip qua trung gian *Agrobacterium*; quá trình sàng lọc được thực hiện trong môi trường MS chứa hygromycin (50mg/l), hạt của thế hệ T2 được sàng lọc liên tục trên môi trường MS chứa hygromycin, và dòng thực vật có tỷ lệ phân ly 3:1 được chọn để sàng lọc liên tục ở thế hệ T3; nếu 100% hạt trong thế hệ T3 có thể sinh trưởng trên MS chứa hygromycin, đây có thể coi là cây đồng hợp tử, và như vậy đã thu được *Arabidopsis thaliana* chuyển gen biểu hiện quá mức gen *OsXCL*.

Đồng thời, *Arabidopsis thaliana* được biến nạp vector biểu hiện 163-1300 không có gen *OsXCL* được sử dụng là đối chứng vector trống.

Thế hệ T3 của *Arabidopsis thaliana* chuyển gen biểu hiện quá mức gen *OsXCL* và đối chứng vector trống được tạo ra, đếm số lượng quả và số lượng lá xoắn. Kết quả được thể hiện trên Fig.16, *Arabidopsis thaliana* chuyển gen biểu hiện quá mức gen *OsXCL* có số lượng lá xoắn và số lượng quả gia tăng đáng kể.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Lúa chuyển gen *OsXCL* được tạo ra bởi phương pháp của sáng chế có trọng

lượng của 100 hạt lên tới 4,224g, so với đối chứng kiểu dại, có mức độ gia tăng 25,1% về trọng lượng, mức độ gia tăng  $\frac{1}{4}$  về chiều dài hạt và mức độ gia tăng 11% về số lượng hạt trên một chùy. *OsXCL* được biểu hiện quá mức ở lúa, gây ra kiểu hình lá xoắn và sự gia tăng đáng kể chiều dài hạt và trọng lượng của 100 hạt cũng như cải thiện chất lượng gạo và số lượng hạt trên một chùy. Việc ứng dụng *OsXCL* không chỉ gia tăng năng suất, mà còn cải thiện chất lượng gạo; hơn nữa, gen này không có ảnh hưởng bất lợi lên quá trình sinh trưởng và phát triển của lúa. Do đó, phương pháp sử dụng gen này là một gen lý tưởng để cải thiện chất lượng của hạt ngũ cốc, như gạo v.v. bằng phương pháp biến đổi công nghệ sinh học và di truyền, và sẽ đóng vai trò tích cực trong quá trình sản xuất an toàn lúa gạo và các loại ngũ cốc khác.



## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp làm tăng trọng lượng hạt của cây trồng, bao gồm bước đưa gen vào trong cây trồng đích để tạo ra cây chuyển gen với trọng lượng hạt được làm tăng lên so với cây trồng đích, trong đó gen được chọn từ bất kỳ trong số các gen dưới đây:

a) gen, mà mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO. 2;

b) gen, có trình tự mã hóa như được thể hiện bởi các vị trí 106 đến 870 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1;

c) gen, có trình tự mã hóa như được thể hiện bởi các vị trí 50 đến 873 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1;

d) gen, lai với gen được xác định trong mục b) hoặc c) nêu trên dưới các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao và mã hóa protein được xác định trong mục a);

e) gen, thể hiện độ tương đồng hơn 80% với gen được xác định trong mục b) hoặc c), trong đó gen mã hóa protein được xác định trong mục a).

2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, gen được đưa vào trong cây trồng đích nhờ vectơ tái tổ hợp bao gồm gen được chọn từ bất kỳ trong số các gen dưới đây:

a) gen, mà mã hóa protein bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO. 2;

b) gen, có trình tự mã hóa như được thể hiện bởi các vị trí 106 đến 870 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1;

c) gen, có trình tự mã hóa như được thể hiện bởi các vị trí 50 đến 873 tính từ đầu 5' của SEQ ID NO. 1;

d) gen, lai với gen được xác định trong mục b) hoặc c) nêu trên dưới các điều kiện có tính nghiêm ngặt cao và mã hóa protein được xác định trong mục a) nêu trên;

e) gen, thể hiện độ tương đồng hơn 80% với gen được xác định trong mục b) hoặc c) nêu trên, trong đó gen này mã hóa protein được xác định trong mục a) nêu trên.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó vectơ tái tổ hợp là vectơ tái tổ hợp thu được bằng cách xen gen, như được xác định trong điểm 1 bởi các mục (a), (b), (c), (d) hoặc

(e), vào trong vị trí đã tách dòng của vector biểu hiện 163-1300; trong đó, phương pháp tạo cấu trúc vector biểu hiện 163-1300 bao gồm bước nối bằng ADN chứa đoạn khởi đầu kép 35S được tạo ra bằng cách cắt pJIT163 bằng enzym KpnI và XhoI với một đoạn lớn được tạo ra bằng cách cắt pCAMBIA1300 bằng enzym KpnI và SalI để tạo ra vector biểu hiện tái tổ hợp.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, khác biệt ở chỗ, cây trồng là cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm; cây trồng được ưu tiên là cây lúa hoặc *Arabidopsis thaliana*.

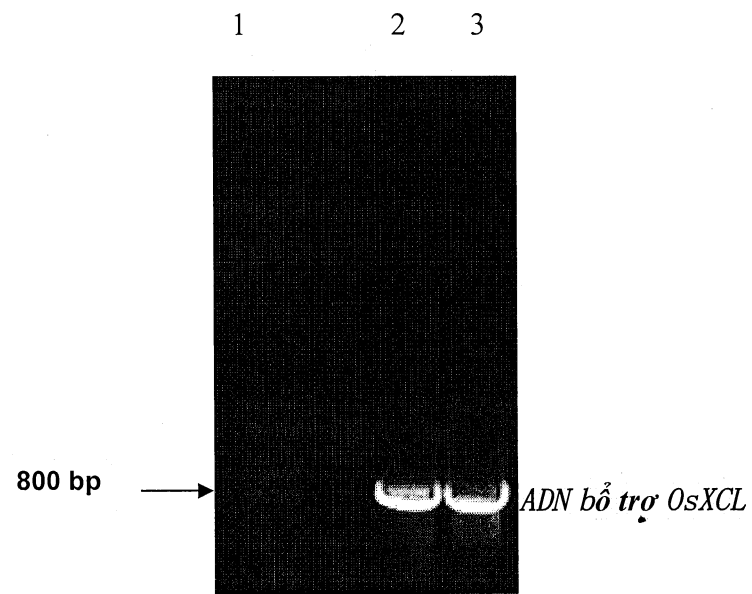


Fig. 1

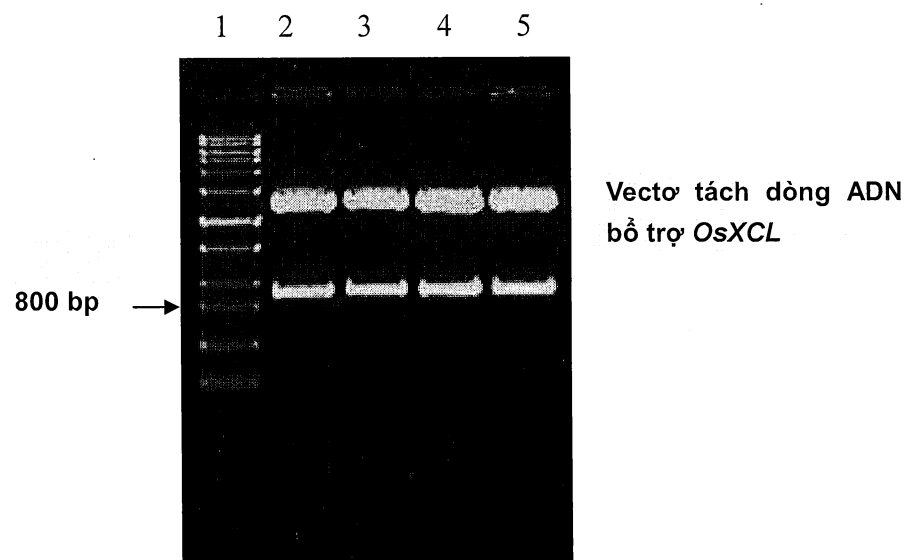


Fig. 2

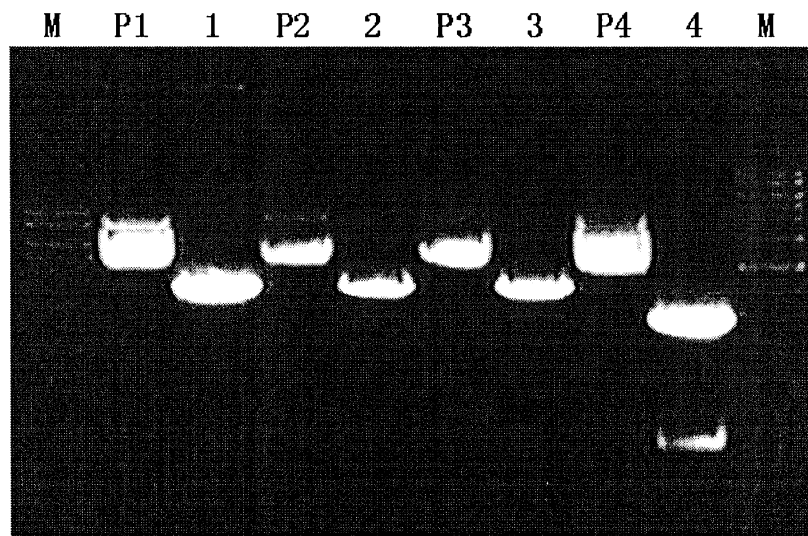


Fig.3

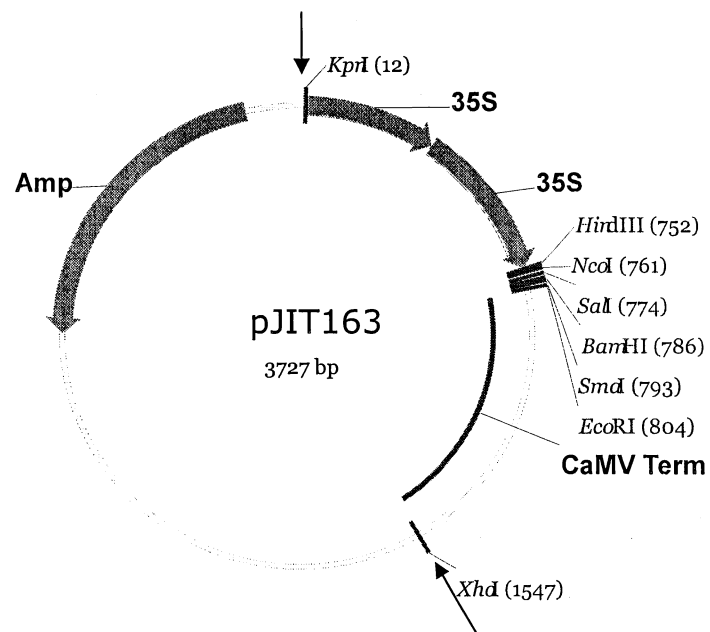


Fig. 4

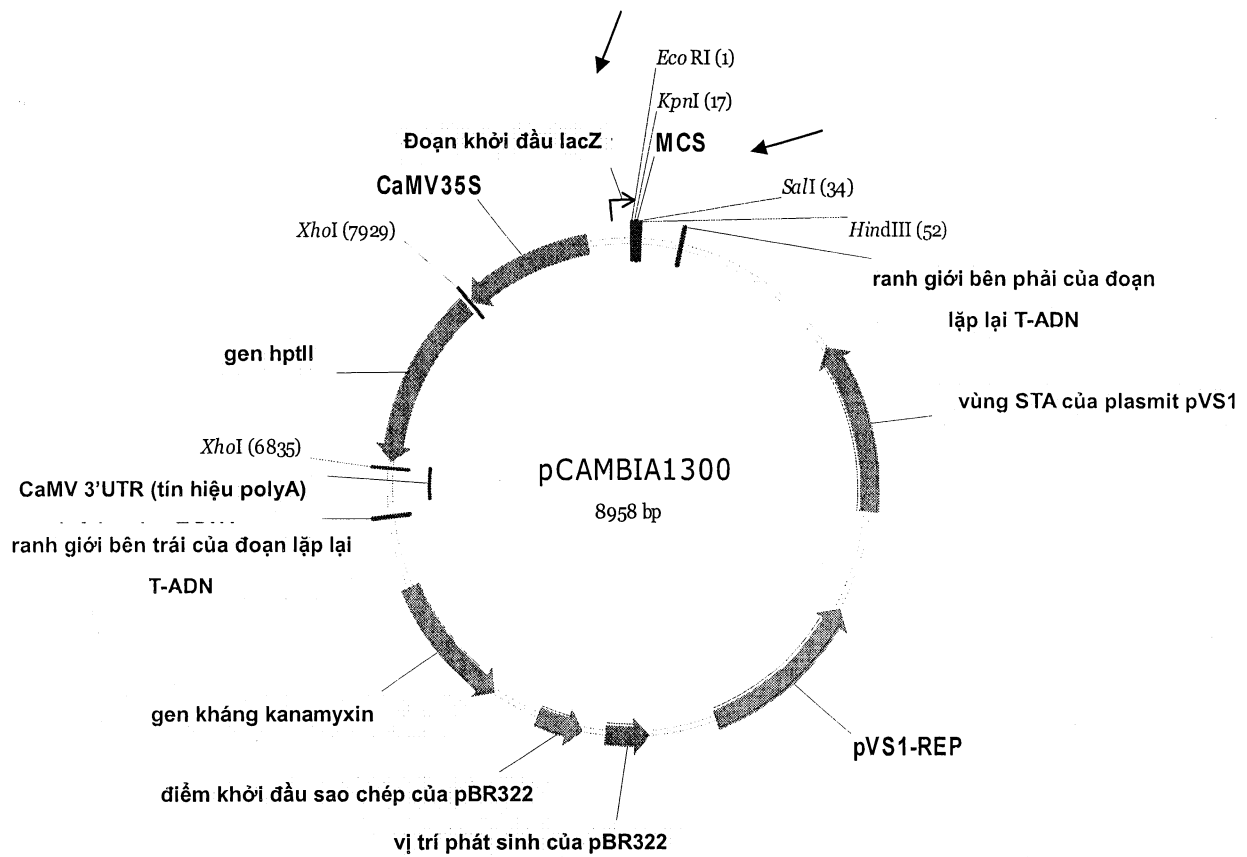


Fig. 5

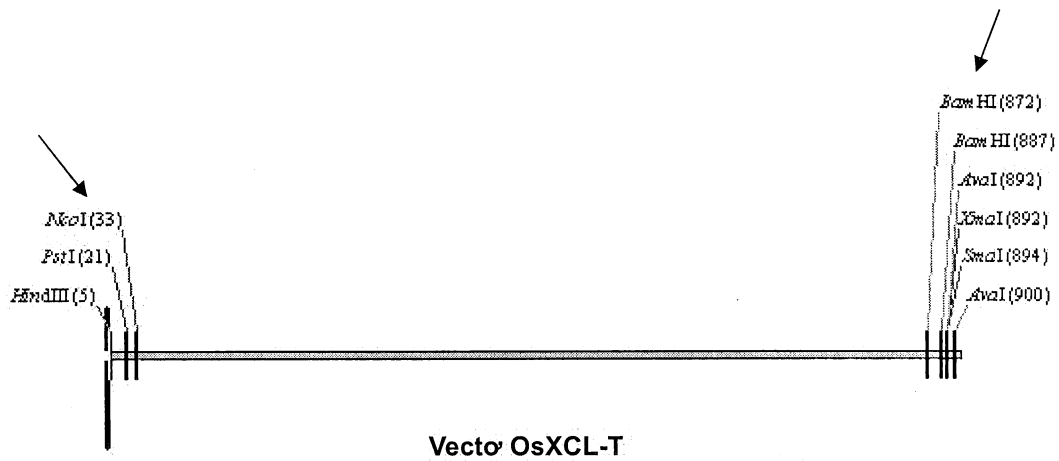
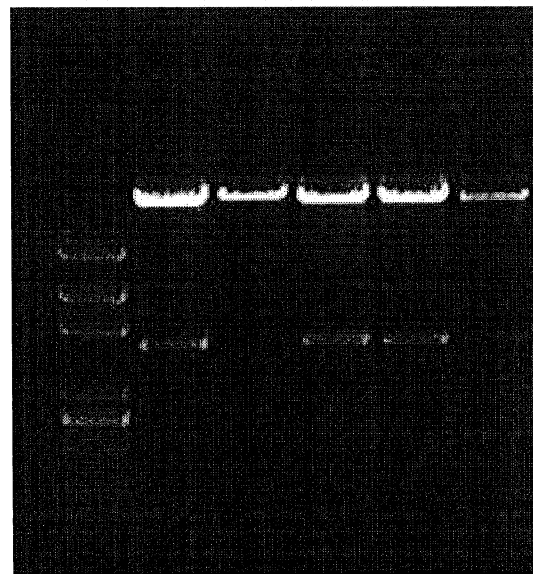


Fig. 6

D2000

Chỉ thị 1 2 3 4 5

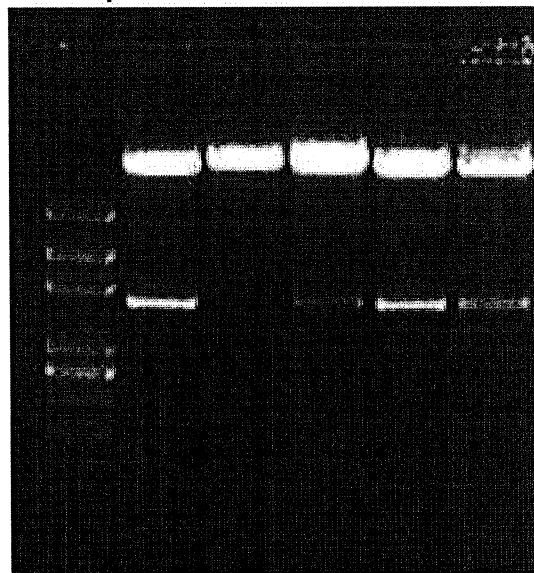


-khoảng 1600 bp

Fig. 7

D2000

chỉ thị 1 2 3 4 5



khoảng 1600 bp

Fig. 8

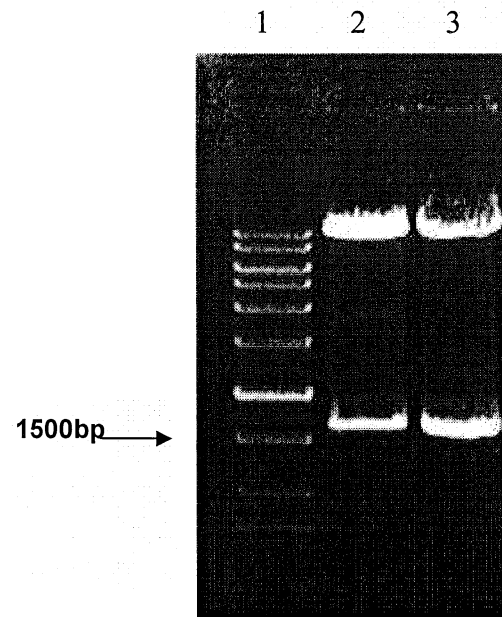


Fig. 9

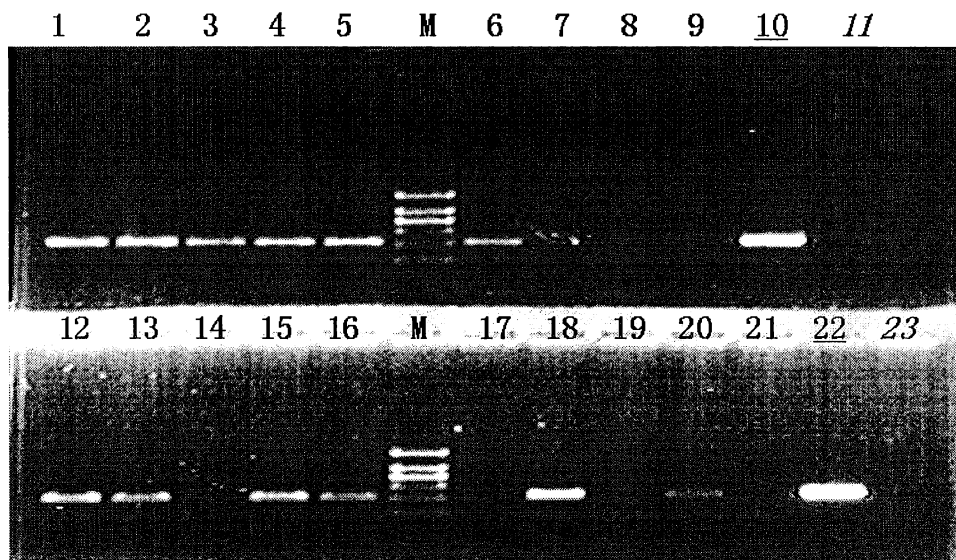


Fig. 10

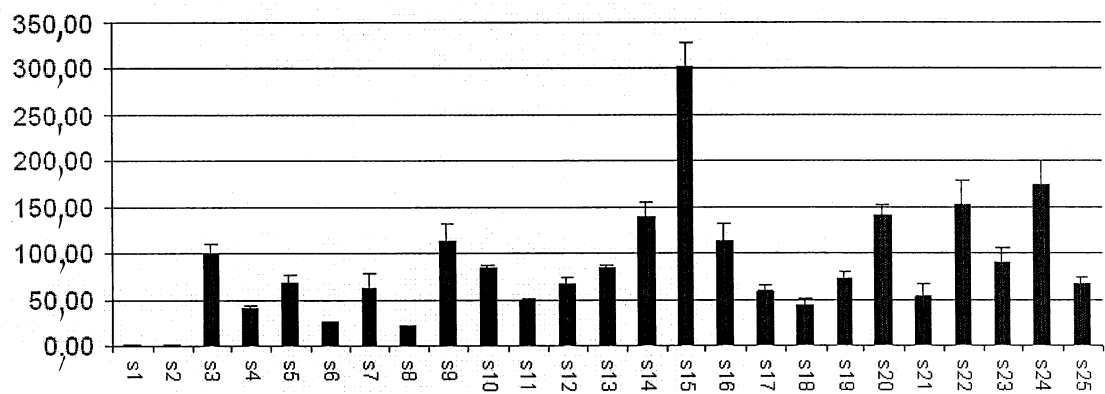


Fig. 11

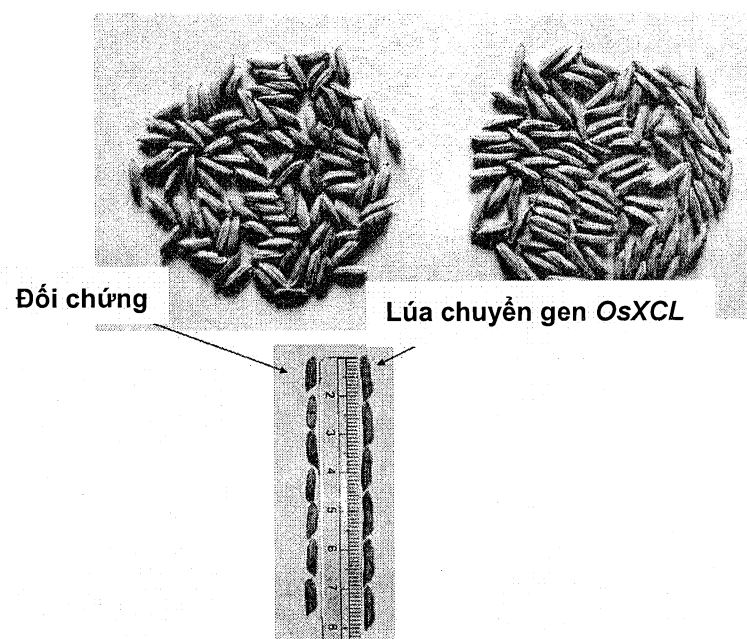


Fig. 12



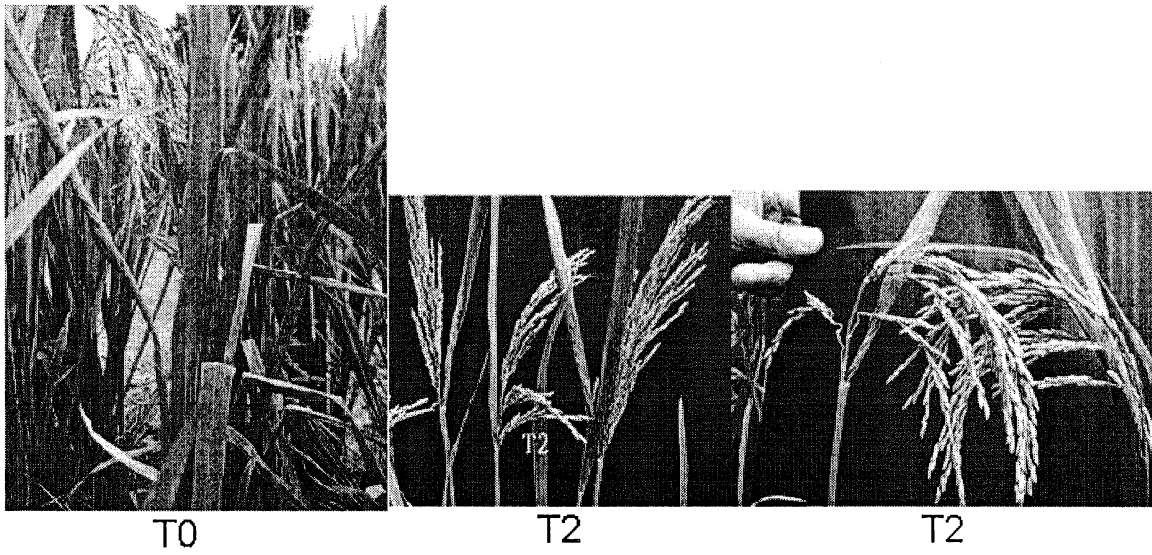
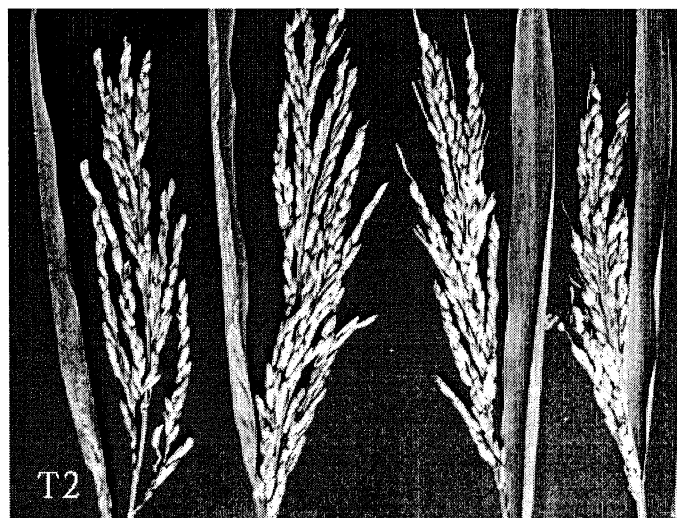


Fig. 13



Lúa chuyển gen *OsXCL* 9311    Đối chứng vector trống 9311

Fig. 14

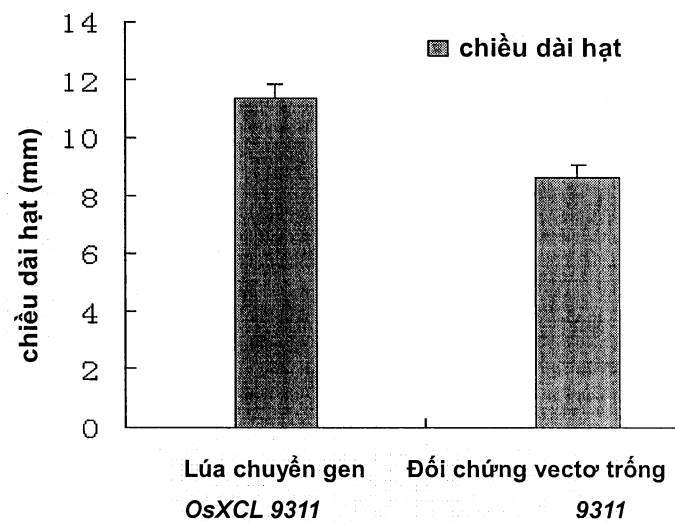


Fig. 15



*Arabidopsis thaliana*  
chuyển gen *OsXCL*

*Arabidopsis thaliana*  
được biến nạp bằng  
vector trống

Fig. 16

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

&lt;110&gt; xia, xinjie

&lt;120&gt; PHƯƠNG PHÁP LÀM TĂNG TRỌNG LƯỢNG HẠT CỦA CÂY TRỒNG

&lt;130&gt; CGGNARL92496

&lt;160&gt; 2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1062

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;400&gt; 1

```

ctcacacacc acaccacacc aacatcgagc gcgtcgagtc gaatccaatc cactccactc      60
caccgccgca tctcctctcc tctcgtctcc ggcgaagacg acgtgatgcc acccagcgcc      120
gccgccgagc ccgcatggc gcagtcgccg gcagcctcc acacgtgat cagcttcggc      180
cgccgcccgc acggcgtcga cgacgatgag gccacgccc cgctcggtcga cgttggtgac      240
gcggagggcg ccgggctcga cctcgacttc gcgttcgagc cgccggtgtc ggcggccgag      300
ctggcgccgg ccgacgacat cttcgcgcac ggccgcatcg tgccggcgta cccggtgttc      360
gaccgcagcc tcctcgacct ctgcccggc gacgcctcca cggcggcgcc ctccgcccgc      420
acctactgag cgtggacgcc gcgtcggcg ccgggctcgc ccggccgaga caggttcccc      480
aagagcggtt ccaccggcgg agagtcgtcg tcgtcatcgc ggcgctggcg cctgcgagac      540
ctcgtcggcg ccggcggccc ctcccgcagc gacggcaagg acaagtctgc cttcctgcac      600
caccacgccc ccgcccgcgc atcatccaaa ctgaagactc ctctcccc tcaacaacca      660
cagcagaaga agcagagcgc cgtgaagacg aagccggcgg cgaagaaggg cgtggtcacc      720
gagatggaca tggccaccgc gcacaggctc ttctacagca aggccagcgc cggcggcgac      780
cggcggccgc agcaagcctc gtacctgacg taccgaccgg cgttcagcgg cctcttcgag      840
ctcggccggt cgcaacacca caccgcctat tagtttaatc acttggtcaa taacaaacc      900
aactgattac tagtggtagt tgttgttaaa ttaattgttt tgttgtaaaa gtgttcaaaa      960
ttttcggcga aattcgagtc gagatttctc gtttgacta gaaccttatc atgtacataa     1020
atggaaaag agaggaatga aatttgagag atgattttgt ct                               1062

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 255

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oryza sativa

&lt;400&gt; 2

```

Met Pro Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ala Met Ala Gln Ser Pro Arg
1          5          10          15
Ser Leu His Thr Leu Ile Ser Phe Gly Arg Gly Ala Asp Gly Val Asp
          20          25          30
Asp Asp Glu Ala Thr Pro Ala Ser Val Asp Val Gly Asp Ala Glu Gly
          35          40          45
Ala Gly Leu Asp Leu Asp Phe Ala Phe Ala Pro Pro Val Ser Ala Ala
          50          55          60
Glu Leu Ala Pro Ala Asp Asp Ile Phe Ala His Gly Arg Ile Val Pro
65          70          75          80
Ala Tyr Pro Val Phe Asp Arg Ser Leu Leu Asp Leu Ser Pro Gly Asp
          85          90          95
Ala Ser Thr Ala Ala Pro Ser Ala Asp Thr Tyr Cys Ala Trp Thr Pro
          100          105          110
Arg Ser Ala Pro Gly Ser Pro Gly Arg Asp Arg Phe Pro Lys Ser Ala
          115          120          125
Ser Thr Gly Gly Glu Ser Ser Ser Ser Arg Arg Trp Arg Leu Arg
          130          135          140
Asp Leu Val Gly Ala Gly Gly Arg Ser Arg Ser Asp Gly Lys Asp Lys
145          150          155          160
Phe Ala Phe Leu His His Ala Ala Ala Pro Pro Ser Ser Lys Leu
          165          170          175

```

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Thr | Pro | Pro | Pro | Pro | Gln | Gln | Pro | Gln | Gln | Lys | Lys | Gln | Ser | Ala |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Val | Lys | Thr | Lys | Pro | Ala | Ala | Lys | Lys | Gly | Val | Val | Thr | Glu | Met | Asp |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Met | Ala | Thr | Ala | His | Arg | Leu | Phe | Tyr | Ser | Lys | Ala | Ser | Ala | Gly | Gly |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Asp | Arg | Arg | Pro | Gln | Gln | Ala | Ser | Tyr | Leu | Thr | Tyr | Arg | Pro | Ala | Phe |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Ser | Gly | Leu | Phe | Ala | Leu | Gly | Arg | Ser | Gln | His | His | Thr | Ala | Tyr |     |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |