



(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) 
1-0020650

(51)⁷ **C12N 15/82**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|---------------|------------|
| (21) | 1-2011-02969 | (22) | 07.04.2010 | | |
| (86) | PCT/US2010/030155 | 07.04.2010 | (87) | WO2010/118077 | 14.10.2010 |
| (30) | 61/167,389 | 07.04.2009 | US | | |
| (45) | 25.03.2019 | 372 | (43) | 27.02.2012 | 287 |
| (73) | DOW AGROSCIENCES LLC (US)
9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054, The United States of America | | | | |
| (72) | SAMUEL, Jayakumar (US), PETOLINO, Joseph (US), SAMBOJU, Narasimha (IN),
WEBB, Steven (CA), YAU, Kerm (CA) | | | | |
| (74) | Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES) | | | | |
-

(54) **PHƯƠNG PHÁP ĐƯA NUCLEAZA ĐẶC HIỆU TRÌNH TỰ VÀO TẾ BÀO THỰC VẬT QUA TRUNG GIAN HẠT NANO VÀ CHẾ PHẨM CHỨA HẠT NANO ĐƯỢC PHỦ NUCLEAZA ĐẶC HIỆU TRÌNH TỰ**

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp đưa nucleaza đặc hiệu trình tự (SSN - Sequence Specific Nuclease) vào tế bào thực vật qua trung gian hạt nano. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm chứa hạt nano được phủ SSN này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp chuyển vận nucleaza đặc hiệu trình tự qua trung gian hạt nano vào tế bào thực vật có thành tế bào. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp cải biến thực vật bằng phương pháp di truyền hoặc theo cách khác để điều trị hoặc phòng bệnh ở các tế bào thực vật có thành tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Có thể lợi dụng các đặc tính đặc biệt của hạt nano để chuyển vận ADN vào trong tế bào. Trong số các dạng hạt nano đã được nghiên cứu (ví dụ hạt vonfram, nhôm, niken, v. v.), hạt nano vàng (GNP - Gold Nano Particle) tỏ ra là hạt dự tuyển tốt cho việc chuyển vận ADN. Vì có độc tính tế bào thấp và dễ tạo nhóm chức với các phối tử có giá trị sinh học khác nhau, nên hạt nano vàng là một lựa chọn được ưu tiên dùng để dùng trong biến nạp. Hạt nano vàng có thể có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1,2 nm đến 600 nm. Phương pháp tổng hợp GNP thường được sử dụng tạo ra bề mặt mang điện tích âm (ví dụ, phủ xitrat) cho các hạt có kích cỡ từ 20 đến 400 nm, còn các hạt GNP có kích cỡ nhỏ hơn từ 1 đến 10 nm thì mang điện tích dương. ADN plasmit, có đủ độ linh động để tháo xoắn một phần các bazơ cấu thành, có thể tiếp cận với các hạt nano vàng. Trong trường hợp GNP được tạo nhóm chức xitrat, ADN plasmit có thể tháo xoắn một phần. Điện tích âm trên khung chính ADN là đủ xa nên lực hút van der Waals giữa các bazơ và hạt nano làm cho ADN plasmit được gắn vào và phủ lên bề mặt của hạt vàng. Còn khi GNP mang điện tích dương, thì lực tĩnh điện và lực van der Waals góp phần làm ADN phủ lên hoặc gắn với hạt.

Ngoài hạt nano kim loại, hạt nano bán dẫn (ví dụ, chấm lượng tử) (“QD -

quantum dot”) với kích cỡ trong khoảng từ 3 đến 5 nm cũng được dùng làm chất mang để chuyển vận phân tử vào trong tế bào. ADN và protein có thể được phủ lên hoặc gắn kết với bề mặt QD được đa chức hóa với phối tử (tham khảo ví dụ ấn phẩm Patolsky, F. , et al. , J. Am. Chem. Soc. 125, 13918 (2003)). Các QD được đa chức hóa là axit carboxylic hoặc amin có thể tạo liên kết ngang với các phân tử chứa nhóm thiol (tham khảo ví dụ ấn phẩm Dubertret B. , et al. , Science 298, 1759 (2002); Akerman, M. E. , W. C. W. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 12617 (2002); Mitchell, G. P. , C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, J. Am. Chem. Soc. 121, 8122 (1999)) hoặc nhóm este N-hydroxysuccinimyl (NHS) bằng cách sử dụng phương pháp liên hợp sinh học tiêu chuẩn (tham khảo ví dụ ấn phẩm Pinaud, F. , D. King, H. -P. Moore, S. Weiss, J. Am. Chem. Soc. 126, 6115 (2004); Bruchez, M. , M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, Science 281, 2013 (1998)). Một phương pháp khác là bổ sung nhiều nhóm chức vào QD thông qua liên hợp với streptavidin. Streptavidin liên hợp với proteins, oligo hoặc kháng thể được biotinyl hóa (tham khảo ví dụ ấn phẩm Dahan M. et al. , Science 302, 442 (2003); Pinaud, F. , D. King, H. -P. Moore, S. Weiss, J. Am. Chem. Soc. 126, 6115 (2004); Dahan M. et al. , Science 302, 442 (2003); Wu . X. Y. , et al. , Nature Biotechnol. 21, 41 (2003); Jaiswal, J. K. , H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon, Nature Biotechnol. 21, 47 (2003); và Mansson , A. , et al. , Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 529 (2004).

Hạt nano đã được dùng để chuyển vận ADN plasmit vào nhiều loại tế bào động vật. Đã thấy rằng khi hạt nano có phủ ADN được ủ với tế bào không có thành tế bào, thì các tế bào này hấp thu hạt nano và bắt đầu biểu hiện gen bất kỳ được mã hóa bởi ADN. Khi muốn chuyển vận hạt nano vào tế bào bình thường có thành tế bào, thì thành tế bào phải được mở ra trước khi đưa các hạt này vào thể nguyên sinh (tham khảo ấn phẩm: Torney, F. et al. , Nature Nanotechnol. 2, (2007)). Trong các tế bào thực vật, thành tế bào có tác dụng như rào cản ngăn sự chuyển vận các phân tử được đưa vào ngoại sinh. Để chuyển vận được gen và phân tử nhỏ vào các tế bào thực vật có thành tế bào, nhiều phương pháp xâm nhập khác như dùng súng bắn gen (chuyển gen bằng cách dùng súng bắn gen biolistic), phương pháp tiêm tế bào, đục lỗ điện, và dùng *Agrobacterium*, đã được

sử dụng. Việc chuyển vận các phân tử và protein nhỏ qua thành tế bào và vào trong tế bào thực vật sẽ tạo điều kiện để phát triển các công nghệ cho phép xử lý *in vitro* và *in vivo* các tế bào, mô, và cơ quan của thực vật nguyên vẹn.

Mặc dù đã hiểu rõ cơ chế ở vi khuẩn, nấm men, tế bào động vật, và rêu, nhưng việc bổ sung gen — tức là việc đưa ADN ngoại lai vào vị trí định trước trong hệ gen — ở thực vật bậc cao vẫn là một thách thức lớn. Sự hợp nhất gen chuyển đặc hiệu tại vị trí ở tế bào thực vật xảy ra với tần suất rất thấp so với sự hợp nhất ngẫu nhiên, ngay cả khi ADN đưa vào chứa vùng căng lớn trình tự tương đồng với ADN cơ thể chủ (Halfter *et al.* 1992; Lee *et al.* 1990; Mía và Lam (1995). Ví dụ, hệ chuyển nhiễm trên cơ sở *Agrobacterium* với hiệu quả cao và chọn lọc thuốc diệt cỏ tạo ra tần số hướng đích gen lên đến 5×10^{-4} ở cây lúa. Những nỗ lực nhằm tăng cường hiệu quả hướng đích gen ở thực vật đã và đang được thực hiện bao gồm việc sử dụng gen đánh dấu chọn lọc âm tính, và việc sử dụng thực vật được điều khiển di truyền để tạo ra tần số hướng đích cao hơn. Mặc dù có những nỗ lực này, thì sự hợp nhất ADN ngẫu nhiên qua các quá trình không tương đồng vẫn là trở ngại chủ yếu cho việc hướng đích gen ở thực vật. Vì việc đưa gen hướng đích vào để cải biến cây trồng trong lĩnh vực công nghệ sinh học trong nông nghiệp và công nghiệp có thể mang lại lợi ích đáng kể, nên giải pháp cho vấn đề này là thật sự cần thiết.

Về khía cạnh này, nhận thấy có sự tăng đáng kể tần suất hướng đích gen trong nhiều hệ thống mô hình thực vật và động vật sau khi cảm ứng sự đứt gãy sợi kép (DSB - double strand break) ADN ở một vị trí hệ gen cụ thể trong tế bào chủ, việc này kích thích một quá trình tự nhiên trong tế bào, đó là quá trình sửa chữa DSB dựa vào tính tương đồng. Có thể sử dụng các endonucleaza đặc hiệu vị trí có trong tự nhiên có các vị trí nhận biết hiếm gặp trong hệ gen thực vật theo cách này để hướng sự hợp nhất gen chuyển vào trình tự đích được đưa vào hệ gen thực vật từ trước thông qua sự hợp nhất ngẫu nhiên. Các nghiên cứu này đã nêu bật tiềm năng của việc cảm ứng DSB được hướng đích để kích thích sự hướng đích gen trong tế bào thực vật, tuy nhiên nhiệm vụ khó khăn là đưa DSB vào locus nguyên thể vẫn chưa được giải quyết.

Ở tế bào động vật, giải pháp cho việc điều biến/xử lý hệ gen đích được thực hiện thông qua nhiều protein gắn kết đặc hiệu trình tự nucleotit như dây kéo loxin (leucine zipper), protein ZFP (zinc finger protein - protein ngón tay kẽm), v. v. . Các protein này tham gia vào quá trình điều hoà gen như là yếu tố phiên mã và/hoặc có thể được dùng để cảm ứng DSB ở vị trí hệ gen nguyên thể. Có thể tạo ra DSB bằng một số nhóm nucleaza đặc hiệu trình tự khác nhau như meganucleaza, dây kéo loxin, protein ZFP, v. v. và gần đây hơn là sự phát triển của phiên bản thể ghép mới của các protein này. Một trong số protein gắn kết đặc hiệu nucleotit được mô tả rõ nhất là protein ZFP (protein ngón tay kẽm). Ngón tay kẽm C2H2 được phát hiện trong yếu tố phiên mã của động vật lưỡng cư TFIIIA, và từ đó được xem như là motif nhận biết ADN phổ biến nhất trong tất cả các loài động vật đa bào. Phân tích cấu trúc tinh thể bằng tia X C2H2 ZFP, Zif268, cho biết cách nhận biết protein-ADN từng thành phần rõ ràng, với mỗi ngón tay kẽm định rõ tiểu vị trí có kích cỡ 3 hoặc 4 bp trong sự sắp xếp thể nối tiếp, và gợi ý khả năng sử dụng motif peptit này như là phần khung protein cho miền gắn kết ADN với tính đặc hiệu mới. Từ đó, nhiều ZFP được thiết kế để gắn kết với trình tự mới đã được sử dụng thành công trong nhiều phòng thí nghiệm khác nhau trong điều kiện các yếu tố phiên mã nhân tạo và các protein thể ghép chức năng khác. Miền protein ngón tay kẽm C2H2 đã được sử dụng như là khung protein cho sự gắn kết ADN đặc hiệu trình tự (Pavelitch and Pabo 1991) và ZFN được tạo ra bằng cách dung hợp miền protein ngón tay kẽm miền với miền nucleaza độc lập với trình tự thu được từ endonucleaza giới hạn kiểu IIS FokI (Kim et al. 1996). Các ZFN được thiết kế đã được sử dụng để tạo ra sự hướng đích hiệu quả cao đến locus hệ gen nội sinh trong tế bào người biến nạp (Moehle et al. 2007) và tế bào người ban đầu (Lombardo et al. 2007).

Những cố gắng đầu tiên trong việc sử dụng ZFN trong thực vật đã cho kết quả hứa hẹn (Lloyd et al. 2005; Wright et al. 2005; Maeder et al. 2008). Cấu trúc mang gen ZFN dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cảm ứng cùng với trình tự nhận biết tương ứng của nó đã được hợp nhất ổn định vào *Arabidopsis* và được chỉ ra là đưa được vào các đột biến hướng đích vào tạo ra từ kết nối đầu cuối không tương đồng ở vị trí nhận biết với tần suất trung bình 7,9% trong cây con thế hệ con được cảm ứng (Lloyd et al. 2005). Tương

tự, trong số 66 cây thuốc lá được tái sinh từ các thể nguyên sinh được biến nạp bằng ZFN được thiết kế để phân cắt ở locus SuRA, có ba khuyết đoạn một cặp bazơ trình bày ở vị trí đích do sửa chữa kết nối đầu cuối không tương đồng (Maeder et al. 2008). Các tế bào cây thuốc lá, chứa gen thông báo phi chức năng được đính gắn từ trước, thiếu 600 cặp bazơ nằm trực tiếp bên sườn trình tự nhận biết ngón tay kềm, khi được đồng biến nạp bằng cấu trúc chứa gen ZFN tương ứng và ADN thể cho tương đồng với trình tự được đính gắn từ trước chứa 600 cặp bazơ bị mất, cho thấy bằng chứng của sự sửa chữa dựa vào tính tương đồng của gen thông báo (Wright et al. 2005). Gần đây nhất, thử nghiệm trên cơ sở nấm men được sử dụng để nhận diện các ZFN có khả năng phân cắt gen endochitinaza của thực vật (Cai et al. , 2009). Sự chuyển vận dùng *Agrobacterium* plasmit Ti gắn cả ZFN và cấu trúc ADN thể cho chứa cassette gen kháng thuốc trừ cỏ *pat* nằm bên sườn là các vùng căng ngắn tương đồng với locus endochitinaza cho sự hợp nhất gen chuyển dựa vào tính tương đồng hướng đích chính xác vào vị trí phân cắt ZFN với hiệu suất lên đến 10%. Điều quan trọng đáng lưu ý là các thiết kế ngón tay kềm khác trên cơ sở thiết kế C3H1 đã được dùng ở thực vật (Shukla et al. , 2009, Cai et al 2009).

Sáng chế đề cập đến phương pháp sử dụng hạt nano để chuyển vận không xâm nhập nucleaza đặc hiệu trình tự vào tế bào thực vật có thành tế bào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các phương án sau được mô tả cùng với các hệ thống, thiết bị và phương pháp chỉ mang tính ví dụ và minh họa, và chứ không nhằm giới hạn phạm vi sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp đưa nucleaza đặc hiệu trình tự (SSN - Sequence Specific Nuclease) vào tế bào thực vật, phương pháp này bao gồm các bước: phủ hạt nano bằng SSN, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được bao bằng peptit thâm nhập tế bào; cho tế bào có thành tế bào và hạt nano được phủ này tiếp xúc với nhau; và cho hạt nano và SSN hấp thu vào tế bào thực vật có thành tế bào.

Theo một khía cạnh khác, các tác giả sáng chế mô tả việc sử dụng hạt nano được phủ SSN để tạo ra tế bào thực vật có thành tế bào chuyển gen, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được bao bằng peptit thâm nhập tế bào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa hạt nano được phủ SSN, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được bao bằng peptit thâm nhập tế bào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào thực vật có thành tế bào và được chuyển nhiễm bằng hạt nano được phủ SSN, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được bao bằng peptit thâm nhập tế bào.

Ngoài các phương án lấy làm ví dụ và các phương án đã nêu trên, các khía cạnh và các phương án khác nữa sẽ trở nên rõ ràng khi tham khảo phần mô tả sau.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 và 2 lần lượt thể hiện biểu hiện của ZFN-IL1 FokI được gắn đuôi histidin (1) và được gắn đuôi phi histidin (2) trong *E. coli*.

FIG. 3 thể hiện tái tổ hợp tương đồng giữa nhiễm sắc thể được kích thích bởi protein dung hợp ngón tay kềm IL-1-FokI; với A thể hiện vector đích và B thể hiện dạng tái tổ hợp với gen GFP được cấu trúc lại.

FIG. 4 là sự thể hiện bằng sơ đồ plasmit pDAB1585.

FIG. 5 thể hiện một dòng tế bào BY2-E có sự nhập nội YFP qua trung gian GNP 2 giờ sau khi ủ các tế bào; Bảng A (FITC), B (Rôđamin), C (DIC), D (A+B), E (A+B+C), F (hình ảnh phản xạ nghịch đảo): Sự nhập nội của YIP được quan sát qua soi kính hiển vi huỳnh quang.

Fig. 6 thể hiện tái tổ hợp tương đồng giữa nhiễm sắc thể được kích thích bởi

protein meganucleaza I-SceI; với A thể hiện vector đích và B thể hiện tái tổ hợp với gen GFP được cấu trúc lại.

Fig. 7 là sự thể hiện bằng sơ đồ plasmid pDAB100375.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần mô tả và các bảng sau đây, có sử dụng một số thuật ngữ. Để có thể hiểu rõ và đúng bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, bao gồm phạm vi cho các thuật ngữ như vậy, các định nghĩa sau được đưa ra:

Lai ngược. Lai ngược có thể là một quá trình trong đó người nhân giống lặp lại lai thể hệ con lai với một trong cha mẹ của chúng, ví dụ, thể lai thể hệ thứ nhất F_1 với một trong số kiểu gen cha mẹ của thể lai F_1 .

Phôi. Phôi có thể là thực vật con nằm trong hạt giống trưởng thành.

Hạt nano. Hạt có kích thước hiển vi có ít nhất một kích cỡ ở quy mô nano, thông thường nhỏ hơn 100 nm. Hạt nano thích hợp để sử dụng theo sáng chế có thể có kích cỡ 1 nm - 0,4 μ m. Chấm lượng tử có thể có đường kính trung bình từ 1 nm — 10 nm, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 2 đến 4 nm. Hạt nano được sử dụng trong đơn này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số hạt nano vàng, hạt nano vonfram, hạt nano phủ vàng, hạt nano xốp, hạt nano mao quản trung bình, hạt nano silic đioxit, hạt nano polyme, hạt nano gelatin, vỏ nano (nanoshell), lõi nano (nanocore), quả cầu nano (nanosphere), que nano (nanorod), hạt nano từ tính, hạt nano bán dẫn, chấm lượng tử, chất nền nano (nanomatrix), chất nền nano dạng nhánh (nanomatrix) và kết hợp của chúng.

Chấm lượng tử. Chấm lượng tử hạt nano bán dẫn giữ chuyển động của điện tử dải dẫn, lỗ giải hóa trị, hoặc exciton (cặp đôi liên kết của điện tử dải dẫn và lỗ giải hóa trị) trong tất cả ba hướng không gian. Sự giữ này có thể là do điện thế tĩnh điện (được tạo ra bởi điện cực bên ngoài, chất kích thích, chùng, tạp chất), với sự có mặt của giao diện giữa các chất bán dẫn khác nhau (ví dụ trong hệ thống tinh thể nano lõi-vỏ), sự có mặt của của

bề mặt bán dẫn (ví dụ tinh thể nano bán dẫn), hoặc kết hợp của các hiện tượng này. Chấm lượng tử có thể có phổ năng lượng lượng tử hóa riêng biệt. Chức năng sóng tương ứng được định vị không gian trong chấm lượng tử, nhưng mở rộng qua nhiều chu kỳ của mạng tinh thể. Chấm lượng tử chứa số lượng nhỏ xác định (vào khoảng 1-100) điện tử dải dẫn, lỗ giải hóa trị, hoặc exciton (tức là một số lượng xác định điện tích cơ bản).

Chất nền nano bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số dendrime. Các dendrime là các hạt nano phỏng hình cầu hoặc có dạng cầu được thiết kế để mang các phân tử được bao trong khoảng trống bên trong hoặc gắn với bề mặt. Các phân tử này là các phân tử mạch nhánh lặp lại; sự phân mạch nhánh cho phép có các tương tác đa hóa trị giữa bề mặt và vật liệu dạng khối. Một ví dụ về dendrime là polyme chuỗi polyamidoamin cation dạng cầu (PAMAM). Các polyme này bao gồm amin bậc một trên bề mặt và amin bậc ba ở phía bên trong. Dạng dendrime này bị thoái biến một phần khi xử lý bằng nhiệt trong dung môi có tính dung môi phân, nhờ đó tạo ra sự hạn chế không gian ít hơn và độ linh động cao hơn. Sự tích điện dương cao của dendrime tạo thuận lợi cho các tương tác tĩnh điện với ADN, và cấu trúc linh động này cho phép dendrime có cấu trúc chặt khi liên kết với ADN và nở ra khi được giải phóng khỏi ADN. Do dendrime có điện tích dương và đặc tính cấu trúc linh động nên hiệu quả chuyển nhiễm hoặc biến nạp cao. Các dendrime có thể mua từ Qiagen (Qiagen, Germantown, MD), là các dendrime được lưu hành trên thị trường với tên SuperfectTM Transfection Reagent (Cat # 301305).

Đa chức. Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “đa chức” sẽ được dùng để mô tả hạt nano đơn chức hoặc đa chức. Các hạt đơn chức sẽ dùng để chỉ hạt nano hoặc khối kết tụ hạt nano được chức hóa mà trên đó các nhóm chức thuộc cùng một dạng đã được liên kết hoá học với. Các hạt đa chức sẽ dùng để chỉ hạt nano hoặc khối kết tụ hạt nano mà trên đó ít nhất hai, và có thể ba hoặc nhiều hơn, dạng nhóm chức khác nhau đã được liên kết hoá học với.

Tính kháng với thuốc diệt cỏ. Tính kháng với liều thuốc diệt cỏ dùng để chỉ khả năng của một thực vật sống sót (tức là thực vật này có thể không bị chết) bởi liều lượng

hoạt chất mà có thể ức chế sự phát triển và/hoặc ngăn không cho thực vật không đề kháng sống sót. Trong một số trường hợp, thực vật dung nạp có thể tạm thời chuyển vàng hoặc theo cách khác có thể hiện một số thương tổn do thuốc diệt cỏ gây ra (ví dụ, đâm chồi quá mức và/hoặc ức chế sự phát triển), nhưng sẽ phục hồi.

Ổn định hóa. Ổn định hóa dùng để chỉ các đặc tính của thực vật được chuyển tái sinh từ một thể hệ này sang thể hệ tiếp theo ở thực vật lai cùng dòng thuộc cùng một giống.

Hấp thu. Hấp thu dùng để chỉ sự chuyển vị hạt hoặc chất nền, như hạt nano, ví dụ hạt nano vàng, dendrime, hoặc chấm lượng tử, qua thành tế bào hoặc màng tế bào, trong đó sự chuyển vị này không chỉ xuất hiện như là kết quả của động lượng được truyền tới hạt này bằng tác động khác ngoài tế bào mà hạt này sẽ được hấp thu vào. Ví dụ không mang tính giới hạn về các thiết bị hoặc phương pháp mà gây ra sự chuyển vị của hạt qua thành tế bào hoặc màng tế bào chỉ do động lượng được truyền vào hạt này là các công nghệ chuyển bằng cách dùng súng bắn gen, súng bắn gen, sự tiêm tế bào, và/hoặc kỹ thuật dùng hạt nano được gọi là *impalefection*.

Axit nucleic. Thuật ngữ “axit nucleic” “polynucleotit” và “oligonucleotit” được sử dụng thay đổi cho nhau và dùng để chỉ polyme deoxyribonucleotit, ribonucleotit, hoặc polyme nucleotit hoặc nucleosit khác, ở cấu dạng mạch thẳng hoặc mạch vòng, và ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Cho các mục đích của bản mô tả này, các thuật ngữ này không được xem như là mang tính giới hạn về chiều dài polyme. Thuật ngữ có thể bao gồm các chất tương tự đã biết của nucleotit có trong tự nhiên, cũng như các nucleotit đã được cải biến ở các gốc bazơ, đường và/hoặc phosphat (ví dụ, khung chính phosphorothioat). Nhìn chung, chất tương tự của nucleotit cụ thể sẽ có cùng tính đặc hiệu cặp đôi bazơ; tức là chất tương tự của A sẽ cặp đôi bazơ với T.

Nhiễm sắc thể. Nhiễm sắc thể là phức hợp chất nhiễm sắc có chứa tất cả hoặc một phần hệ gen của của tế bào. Hệ gen của một tế bào thường đặc trưng ở kiểu hình nhân của nó, là sự thu thập của tất cả các nhiễm sắc thể chứa hệ gen của tế bào. Hệ gen của một tế

bào có thể chứa một hoặc nhiều nhiễm sắc thể. “Thể bổ sung” là axit nucleic, phức hợp nucleoprotein hoặc cấu trúc khác có đặc tính sao chép chứa axit nucleic mà không phải là một phần của kiểu hình nhân nhiễm sắc thể của tế bào. Ví dụ về thể bổ sung bao gồm plasmid và một số hệ gen của virus. “Vùng tiếp cận được” là vị trí trong chất nhiễm sắc tế bào trong đó vị trí đích có mặt trong axit nucleic này có thể được liên kết với phân tử ngoại sinh nhận biết vị trí đích. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể bất kỳ, cho rằng vùng tiếp cận được là vùng không được bao gói vào cấu trúc thể nhân. Thường có thể phát hiện được cấu trúc khác biệt của vùng tiếp cận được dựa vào tính nhạy của nó đối với các mẫu dò hóa chất và enzym, ví dụ, các nucleaza. “Vị trí đích” hoặc “trình tự đích” là trình tự axit nucleic xác định phần axit nucleic mà phân tử gắn kết sẽ gắn kết với, khi có đủ điều kiện cho sự gắn kết. Ví dụ, trình tự 5'-GAATTC-3' là vị trí đích cho endonucleaza giới hạn Eco RI.

Gen. Với các mục đích của bản mô tả này, gen bao gồm vùng ADN mã hoá sản phẩm gen, cũng như tất cả vùng ADN điều hòa sự sản xuất một sản phẩm gen, cho dù rằng trình tự điều hoà như vậy là nằm cạnh trình tự mã hoá và/hoặc trình tự được phiên mã hay không. Theo đó, một gen bao gồm, nhưng không nhất thiết chỉ giới hạn ở, trình tự gen khởi đầu, gen kết thúc, trình tự điều hoà dịch mã như vị trí gắn kết ribosom và vị trí đầu vào ribosom nội tại, gen tăng cường, gen câm, gen cách ly, các yếu tố biên, nguồn gốc sao chép, vị trí đính với chất nền và vùng không chế locus.

Biểu hiện. Các thuật ngữ biểu hiện hoặc biểu hiện gen được sử dụng thay đổi cho nhau, và dùng để chỉ sự chuyển hóa của thông tin, chứa trong một gen, thành sản phẩm gen. Sản phẩm gen có thể là sản phẩm phiên mã trực tiếp của một gen (ví dụ, ARN thông tin, ARN chuyển vận, ARN ribosom, ARN đối nghĩa, ribozym, ARN cấu trúc hoặc dạng ARN bất kỳ khác) hoặc protein tạo ra qua quá trình dịch mã ARN thông tin. Các sản phẩm gen còn bao gồm các ARN được cải biến, bằng các quy trình như gắn mũ, bổ sung chuỗi poly (A), metyl hóa, và sửa chữa, và protein được cải biến bằng, ví dụ, quá trình metyl hóa, axetyl hoá, phosphoryl hóa, ubiquitin hóa, ribosyl hóa ADP, myristil hóa, và sự glycosyl hoá. Sự “điều biến” biểu hiện gen dùng để chỉ sự thay đổi hoạt tính của một

gen. Sự điều biến biểu hiện có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, quá trình hoạt hoá gen và ức chế gen.

Protein. Các thuật ngữ “polypeptit,” “peptit” và “protein” được sử dụng thay cho nhau dùng để chỉ polyme của gốc axit amin. Thuật ngữ này cũng áp dụng cho polyme axit amin trong đó một hoặc nhiều axit amin là các chất hoá học tương tự hoặc các dẫn xuất cải biến của các axit amin xuất hiện trong tự nhiên tương ứng.

Trình tự. Thuật ngữ “trình tự” dùng để chỉ trình tự nucleotit có chiều dài bất kỳ, có thể là ADN hoặc ARN, có thể là mạch thẳng, mạch vòng hoặc mạch nhánh và có thể là sợi đơn hoặc sợi đôi. Thuật ngữ “trình tự thể cho” dùng để chỉ trình tự nucleotit được đưa vào hệ gen. Trình tự thể cho có thể có chiều dài bất kỳ, ví dụ có chiều dài nằm trong khoảng từ 2 đến 25000 nucleotit (hoặc giá trị nguyên bất kỳ nằm trong khoảng này hoặc ngoài khoảng này), tốt hơn nếu có chiều dài nằm trong khoảng từ 100 đến 5000 nucleotit (hoặc giá trị nguyên bất kỳ nằm trong khoảng này), tốt hơn nữa nếu có chiều dài nằm trong khoảng từ 200 đến 2500 nucleotit.

Trình tự tương đồng. Trình tự tương đồng dùng để chỉ trình tự thứ nhất có chung mức đồng nhất trình tự với trình tự thứ hai, và trình tự thứ nhất có thể đồng nhất với trình tự thứ hai. “Trình tự tương đồng, không đồng nhất” dùng để chỉ trình tự thứ nhất có chung mức đồng nhất trình tự với trình tự thứ hai, nhưng trình tự của trình tự thứ nhất này không đồng nhất với trình tự của trình tự thứ hai. Ví dụ, polynucleotit chứa trình tự kiểu đại của gen đột biến là tương đồng và không đồng nhất với trình tự của gen đột biến. Theo một số phương án, mức độ tương đồng giữa hai trình tự là đủ để cho phép xảy ra hiện tượng tái tổ hợp tương đồng giữa chúng, bằng cách sử dụng có chế tế bào thông thường. Hai trình tự tương đồng không đồng nhất có thể có chiều dài bất kỳ và mức độ không tương đồng của chúng có thể nhỏ chỉ là một nucleotit (ví dụ, để hiệu chỉnh đột biến điểm của hệ gen bằng tái tổ hợp tương đồng hướng đích) hoặc lớn là 10 hoặc nhiều kilobazơ (ví dụ, để cài xen một gen ở một vị trí định trước trong nhiễm sắc thể). Hai polynucleotit chứa trình tự tương đồng không đồng nhất nhất thiết phải có cùng

chiều dài. Ví dụ, có thể sử dụng polynucleotit ngoại sinh (tức là polynucleotit thể cho) có trong khoảng từ 20 đến 10000 nucleotit hoặc cặp nucleotit.

Tái tổ hợp. Tái tổ hợp dùng để chỉ quá trình trao đổi thông tin di truyền giữa hai polynucleotit. Cho mục đích của bản mô tả này, “tái tổ hợp tương đồng (homologous recombination - HR)” dùng để chỉ một dạng trao đổi đặc biệt mà diễn ra, ví dụ, trong quá trình sửa chữa sự đứt gãy sợi đôi trong các tế bào. Quá trình này đòi hỏi sự tương đồng trình tự nucleotit, sử dụng phân tử “thể cho” làm khuôn mẫu sửa chữa phân tử “đích” (tức là phân tử đã đứt gãy sợi đôi), và đã biết đến một cách khác nhau là “sự chuyển hóa gen không vắt chéo - non-crossover gene conversion” hoặc “sự chuyển hoá gen dải ngắn - short tract gene conversion” vì nó dẫn đến sự chuyển đổi thông tin di truyền từ thể cho đến đích. Không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết bất kỳ, sự chuyển đổi như vậy có thể bao gồm sự hiệu chỉnh không phù hợp của ADN dị sợi đúng được tạo ra giữa sợi đích bị gãy và thể cho, và/hoặc “sự tôi sợi phụ thuộc quá trình tổng hợp” (SDSA - synthesis-dependent strand annealing), trong đó thể cho được dùng để tổng hợp lại thông tin di truyền sẽ trở thành một phần của sợi đích, và/hoặc các quy trình tương tự. Quá trình HR đặc biệt như vậy thường tạo ra sự biến đổi trình tự của phân tử đích sao cho một phần hoặc toàn bộ trình tự của polynucleotit thể cho được kết hợp vào polynucleotit đích.

Sự phân cắt. “Sự phân cắt,” “gây ra đứt gãy sợi kép” và “cắt” được sử dụng thay đổi cho nhau và dùng để chỉ sự đứt gãy khung chính đồng hoá trị của phân tử ADN. Sự phân cắt có thể được khơi mào bằng hàng loạt phương pháp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, thủy phân bằng enzym hoặc hoá học liên kết phosphodiester bond. Có thể có cả sự phân cắt sợi đơn và sự phân cắt sợi kép, và sự phân cắt sợi kép có thể xuất hiện là kết quả của hai hiện tượng phân cắt sợi đơn riêng biệt. Sự phân cắt ADN có thể dẫn đến tạo ra đầu cùn hoặc đầu dính. Theo một số phương án, polypeptit liên hợp được sử dụng cho sự phân cắt ADN sợi kép hướng đích. “Miền phân cắt” là một hoặc nhiều trình tự polypeptit có hoạt tính xúc tác cho sự phân cắt ADN. Miền phân cắt có thể được chứa trong một mạch polypeptit hoặc hoạt tính phân cắt có thể tạo ra từ sự kết hợp của hai (hoặc nhiều) polypeptit. “Nửa miền phân cắt” là trình tự polypeptit mà, kết hợp với dạng

polypeptit thứ hai (hoặc là đồng nhất hoặc khác nhau) tạo thành phức hợp có hoạt tính phân cắt (tốt hơn nếu là hoạt tính phân cắt sợi kép). Các từ sự đứt gãy sợi kép và sự phân cắt sợi kép được sử dụng thay đổi cho nhau.

Chất nhiễm sắc. Chất nhiễm sắc là cấu trúc nucleoprotein chứa hệ gen tế bào. Chất nhiễm sắc tế bào chứa axit nucleic, chủ yếu là ADN, và protein, bao gồm protein nhiễm sắc thể histon và phi histon. Phần lớn chất nhiễm sắc tế bào có nhân điển hình tồn tại ở dạng thể nhân, trong đó lõi thể nhân chứa khoảng 150 cặp bazơ ADN liên hệ với octame chứa hai loại trong số histon H2A, H2B, H3 và H4; và ADN liên kết (có chiều dài thay đổi tùy thuộc vào sinh vật) kéo dài giữa các lõi thể nhân. Phân tử histon HZ thường liên kết với ADN liên kết. Cho các mục đích của bản mô tả này, thuật ngữ “chất nhiễm sắc” dùng để chỉ bao gồm tất cả các dạng nucleoprotein tế bào, của cả tế bào chưa có nhân điển hình và có nhân điển hình. Chất nhiễm sắc tế bào bao gồm cả chất nhiễm sắc nhiễm sắc thể và chất nhiễm sắc episome.

Gắn kết. Sự gắn kết dùng để chỉ tương tác không đồng hoá trị đặc hiệu trình tự giữa các phân tử lớn (ví dụ, giữa protein và axit nucleic). Không nhất thiết tất cả hợp phần của tương tác gắn kết phải là đặc hiệu trình tự (ví dụ, tiếp xúc với gốc phosphat trong khung ADN), chỉ cần là tương tác xét trên toàn thể là đặc hiệu trình tự. Các tương tác như vậy thường đặc trưng ở hằng số phân ly (K_d) vào $10^{-6}M^{-1}$ hoặc thấp hơn. “Ái lực” dùng để chỉ cường độ của sự gắn kết: ái lực gắn kết tăng lên liên quan đến K_d thấp hơn.

Mối liên kết có điều khiển. Các thuật ngữ “mối liên kết có điều khiển” và “liên kết có điều khiển” (hoặc “được liên kết có điều khiển”) được sử dụng thay đổi cho nhau dùng để chỉ sự nằm kề cận nhau của hai hợp phần hoặc nhiều hơn (như các thành phần trình tự), trong đó các hợp phần này được bố trí sao cho cả hai hợp phần này thực hiện chức năng bình thường và có khả năng là ít nhất một trong số các hợp phần này có thể làm dàn xếp chức năng được thể hiện khi có ít nhất một hợp phần khác. Như là ví dụ minh họa, trình tự điều hoà phiên mã, như một gen khởi đầu chẳng hạn, được liên kết có điều khiển với trình tự mã hoá nếu trình tự điều hoà phiên mã không chế mức độ phiên

mã của trình tự mã hoá để đáp ứng lại sự có hoặc vắng mặt của một hoặc nhiều yếu tố điều hoà phiên mã. Một trình tự điều hoà phiên mã thường liên kết có điều khiển với trình tự mã hoá, nhưng không nhất thiết là trực tiếp nằm cạnh nó. Ví dụ, gen tăng cường là trình tự điều hoà phiên mã được liên kết có điều khiển với trình tự mã hoá, ngay cả khi chúng không nằm kề nhau. Với polypeptit liên hợp, thuật ngữ “liên kết có điều khiển” có thể dùng để chỉ rằng mỗi trong số hợp phần này thực hiện cùng chức năng khi liên kết với hợp phần khác như nó có thể thực hiện nếu nó không được liên kết. Ví dụ, đối với polypeptit liên hợp trong đó miền gắn kết với ADN ZFP được liên hợp với miền phân cắt, thì miền gắn kết với ADN ZFP và miền phân cắt này là có mối liên kết có điều khiển nếu như, trong polypeptit liên hợp này, phần miền gắn kết với ADN ZFP có khả năng gắn kết với vị trí đích của nó và/hoặc vị trí gắn kết của nó, trong khi đó miền phân cắt có khả năng phân cắt ADN ở vùng kề cận vị trí đích.

Nucleaza đặc hiệu trình tự (SSN - Sequence Specific Nuclease) — bao gồm một số nhóm protein lưỡng chức có khả năng nhận biết trình tự nucleotit đặc hiệu và duy nhất (vị trí nhận biết nguyên thể hoặc tùy biến) như, nhưng không chỉ giới hạn trong số, meganucleaza, dây kéo loxin (leucine zipper) và protein ZFP (zinc finger protein - protein ngón tay kẽm). Các meganucleaza là họ các enzym có thể phân cắt ADN sợi kép với tính đặc hiệu cao trong sự có mặt của ion kim loại hoá trị hai (Ca, Mn, Mg). Tuy nhiên, các meganucleaza này khác với endonucleaza giới hạn ở đặc tính nhận biết và cấu trúc của chúng (Belfort, M. Roberts RJ. Homing endonucleases: keeping the house in order; *Nucleic Acid Research* 1997, 25: 3379-3388). Đặc biệt là, trong khi các enzym giới hạn nhận biết các trình tự axit nucleic (3-8 cặp bazơ), các meganucleaza nhận biết các trình tự dài hơn (12-40 cặp bazơ) — điều này tạo ra tính đặc hiệu được cải thiện đối với việc hướng đích DSB. (Mueller, JE, Bryk, M. Loizos, N. Belfort M. Homing endonucleases. Trong *Nucleases* 2nd Edition. Linn, SM, Lloyd, RS, Roberts, RJ (Eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1993 111-143.). Dây kéo loxin (leucine zipper) — là nhóm các protein tham gia vào tương tác protein-protein trong nhiều protein điều hoà của sinh vật có nhân điển hình là các yếu tố phiên mã quan trọng gắn liền với biểu hiện gen. Dây kéo loxin dùng để chỉ motif cấu trúc chung trong các yếu tố phiên mã này trong một số giới bao

gồm động vật, thực vật, nấm men, v. v. Dây kéo loxin được tạo ra bởi hai polypeptit (homodime hoặc heterodime) gắn kết với các trình tự ADN đặc hiệu theo cách thức là các gốc loxin nằm cách đều trong suốt chuỗi xoắn ỏ, sao cho các gốc loxin của hai polypeptit kết thúc trên cùng một bề mặt của chuỗi xoắn.

Protein gắn kết ADN ngón tay kẽm. Protein gắn kết ADN ngón tay kẽm, ZFP - zinc finger DNA binding protein, (hoặc miền gắn kết) là protein, hoặc miền trong phân tử protein lớn hơn, mà gắn kết ADN theo cách thức đặc hiệu trình tự thông qua một hoặc nhiều ngón tay kẽm, là vùng trình tự axit amin trong miền gắn kết có cấu trúc được ổn định thông qua liên kết phối trí với ion kẽm. Thuật ngữ protein gắn kết ADN ngón tay kẽm thường được viết tắt là protein ZFP (zinc finger protein - protein ngón tay kẽm) hoặc ZFP. Miền gắn kết ngón tay kẽm có thể “được điều khiển” để gắn kết với trình tự nucleotit định trước. Ví dụ không mang tính giới hạn về các phương pháp điều khiển protein ZFP là thiết kế và chọn lọc. Protein ngón tay kẽm là protein không xuất hiện trong tự nhiên mà thiết kế/thành phần của nó chủ yếu nảy sinh từ tiêu chuẩn hợp lý. Tiêu chuẩn hợp lý cho thiết kế bao gồm việc áp dụng các quy tắc thay thế và thuật toán được lập trình để xử lý thông tin trong nguồn dữ liệu lưu giữ thông tin của các thiết kế ZFP hiện có và số liệu gắn kết. Tham khảo, ví dụ, các patent Mỹ 6,140,081; 6,453,242; 6,534,261; và 6,785,613; see, also WO 98153058; WO 98153059; WO 98153060; WO 021016536 và WO 031016496; và các patent Mỹ 6,746,838; 6,866,997; và 7,030,215.

Trình tự hệ gen. Trình tự hệ gen bao gồm các trình tự có trong nhiễm sắc thể, thể bổ sung, hệ gen trong các bào quan (ví dụ, ty thể, lục lạp), nhiễm sắc thể nhân tạo và dạng axit nucleic bất kỳ khác có mặt trong tế bào ví dụ như nhiễm sắc thể nhỏ kép trình tự được khuếch đại và hệ gen của vi khuẩn và virus nội sinh hoặc gây nhiễm. Các trình tự hệ gen có thể là bình thường (tức là kiểu dại) hoặc đột biến; trình tự đột biến có thể chứa, ví dụ, đoạn cài xen, khuyết đoạn, sự chuyển vị, 25 tái bố trí, và/hoặc đột biến điểm. Trình tự hệ gen cũng có thể chứa một trong một số các alen khác nhau.

Tế bào thực vật. Tế bào thực vật bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số các

tế bào của thực vật một lá mầm (cây một lá mầm) hoặc hai lá mầm (cây hai lá mầm) hoặc tảo hoặc rêu. Ví dụ không mang tính giới hạn về cây một lá mầm bao gồm các thực vật ngũ cốc như cây ngô, lúa, lúa mạch, yến mạch, lúa mì, lúa miến, lúa mạch đen, cây sugarmay, dừa, hành, cây chuối, và cây dừa. Ví dụ không mang tính giới hạn về cây hai lá mầm bao gồm cây thuốc lá, cây cà chua, cây hướng dương, cây bông, cây củ cải đường, cây khoai tây, rau diếp, cây dưa, cây đậu tương, cây mayola (cây nho), và cỏ linh lăng. Các tế bào thực vật có thể từ phần bất kỳ của thực vật và/hoặc từ giai đoạn phát triển thực vật bất kỳ.

Vùng quan tâm. Vùng quan tâm là vùng bất kỳ của polyme axit nucleic, ví dụ, gen hoặc trình tự không mã hoá nằm trong hoặc nằm cạnh gen, mong muốn gắn kết phân tử ngoại sinh vào trong đó. Sự gắn kết có thể nhằm mục đích phân cắt ADN đích và/hoặc tái tổ hợp hướng đích. Vùng quan tâm có thể có mặt ví dụ trong nhiễm sắc thể, thể bổ sung, hệ gen cơ quan thể bao (ví dụ, ty thể, lục lạp), plasmit, hệ gen virus gây nhiễm, hoặc trình tự nucleotit bất kỳ khác. Vùng quan tâm có thể trong vùng mã hoá của gen, trong các vùng không mã hoá được phiên mã như, ví dụ, đoạn dẫn đầu, trình tự kéo sau hoặc intron, hoặc trong các vùng không được phiên mã, hoặc ở phía trước hoặc nằm sau vùng mã hoá. Vùng quan tâm có thể chỉ là vùng nhỏ như là một cặp đôi nucleotit hoặc có chiều dài lên đến 25000 cặp đôi nucleotit, hoặc giá trị nguyên bất kỳ của cặp đôi nucleotit.

Theo các phương án của sáng chế, sáng chế đề xuất phương pháp đưa nucleaza đặc hiệu trình tự vào tế bào thực vật có thành tế bào, phương pháp này bao gồm việc cho hạt nano được phủ nucleaza đặc hiệu trình tự tiếp xúc với tế bào thực vật và cho phép hấp thu qua thành tế bào thực vật. Theo khía cạnh đặc biệt của sáng chế, hạt nano có thể là hạt nano bất kỳ và có thể chứa, được phủ bằng, hoặc theo cách khác được liên kết với và/hoặc mang đảo ngược hoặc không đảo ngược nucleaza ngón tay kềm, và/hoặc meganucleaza. Theo một số phương án, nucleaza ngón tay kềm có thể được đưa vào hạt nano trước khi tiếp xúc với tế bào thực vật có thành tế bào hoặc vào cùng một lúc với khi đưa hạt nano vào tế bào thực vật có thành tế bào. Ví dụ về các hạt nano mà có thể được sử dụng theo các phương án của sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số hạt nano vàng,

chấm lượng tử, hạt nano phủ vàng, hạt nano xốp, hạt nano mao quản trung bình, hạt nano silic đioxit, hạt nano polyme, hạt nano vonfram, hạt nano gelatin, vỏ nano (nanoshell), lõi nano (nanocore), quả cầu nano (nanosphere), que nano (nanorod), hạt nano từ tính, hạt nano bán dẫn, chấm lượng tử, chất nền nano (nanomatrix), dendrime và/hoặc kết hợp của chúng.

Theo các phương án của sáng chế, tế bào thực vật có thành tế bào có thể lát tế bào thực vật bất kỳ có thành tế bào nguyên vẹn và toàn bộ. Các phương án theo sáng chế có thể bao gồm các tế bào có thành tế bào từ mô bất kỳ hoặc ở bất kỳ nơi nào mà chúng có mặt, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn trong số, ở phôi, tế bào mô phân sinh, thể chai, hạt phấn, lá, bao phấn, rễ, đầu rễ, hoa, hạt, vỏ, thân, hỗn dịch nuôi cấy, và nuôi cấy mô.

Theo các phương án đặc biệt của sáng chế, SSN có thể là ZFN bất kỳ mà có thể được chuyển vận đến tế bào thực vật theo sáng chế. Ví dụ, ZFN có thể chứa protein dung hợp chứa miền phân cắt (hoặc nửa miền phân cắt) và miền gắn kết ngón tay kẽm, polynucleotit mã hoá các protein này và kết hợp của các polypeptit và polynucleotit mã hoá polypeptit. Miền gắn kết ngón tay kẽm có thể chứa một hoặc nhiều ngón tay kẽm (ví dụ, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ngón tay kẽm hoặc nhiều hơn), và có thể được điều khiển để gắn kết với vùng quan tâm bất kỳ. Do đó, bằng cách nhận diện vùng đích quan tâm mà muốn có sự phân cắt hoặc tái tổ hợp tại đó, chuyên gia, theo các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này, có thể cấu trúc nên một hoặc nhiều protein dung hợp chứa miền phân cắt (hoặc nửa miền phân cắt) và miền ngón tay kẽm được điều khiển để nhận biết trình tự đích trong vùng quan tâm nêu trên. Sự có mặt của protein dung hợp như vậy (hoặc các protein) trong tế bào sẽ tạo ra sự gắn kết của protein dung hợp hoặc các protein dung hợp với vị trí gắn kết của nó và sự phân cắt trong hoặc gần vùng quan tâm nêu trên. Hơn nữa, nếu như cũng có mặt polynucleotit ngoại sinh tương đồng với vùng quan tâm trong tế bào này, có xảy ra sự tái tổ hợp tương đồng với mức cao giữa trình tự nucleotit đứt gãy sợi kép và polynucleotit ngoại sinh.

Theo các phương án đặc biệt, việc cấp ít nhất một SSN cho tế bào có thể bao gồm việc cấp trực tiếp một hoặc nhiều bản sao của protein SSN đến tế bào nhờ hạt nano. Theo các phương án khác, việc cấp ít nhất SSN cho tế bào có thể bao gồm việc cấp cho tế bào hạt nano bao gồm axit nucleic mã hoá SSN và cho phép tế bào tạo ra SSN từ axit nucleic mã hoá nó.

Theo các phương án khác, một hoặc nhiều SSN được tạo ra cho tế bào có khả năng phân cắt, một cách đơn lẻ, hoặc phối hợp với các SSN khác, tại hoặc ở gần một hoặc nhiều vùng quan tâm. Theo các phương án đặc biệt, một hoặc nhiều vùng quan tâm có thể nằm trong trình tự mã hoá của protein biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo một số phương án, một hoặc nhiều vùng quan tâm có thể nằm gần và/hoặc nằm trong locus chứa trình tự nucleotit mã hoá protein biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án khác, trình tự nucleotit có thể đứt gãy sợi kép ở một vùng quan tâm. Theo các phương án tiếp theo, trình tự nucleotit có thể đứt gãy sợi kép ở hai vùng quan tâm hoặc nhiều hơn. Theo các phương án đặc biệt, một hoặc nhiều đứt gãy sợi kép có thể nằm ở trình tự mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều đứt gãy sợi kép có thể nằm gần và/hoặc nằm trong locus chứa trình tự nucleotit mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất.

Theo một phương án đặc biệt, trong đó ít nhất hai đứt gãy sợi kép được tạo ra, việc sửa chữa đứt gãy sợi kép có thể bao gồm việc loại chất liệu nằm giữa các đứt gãy sợi kép và kết nối lại các đầu cuối của trình tự nucleotit để cắt đi các trình tự nằm giữa các đứt gãy sợi kép. Theo các phương án, các trình tự bị cắt có thể chứa, không mang tính giới hạn, các trình tự mã hoá tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án tiếp theo, trình tự bị cắt này có thể chứa, không mang tính giới hạn, các trình tự điều hoà gây ảnh hưởng đến biểu hiện protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án như vậy, biểu hiện của protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất bị giảm đi so với mức biểu hiện trước khi phân cắt.

Theo các phương án thay thế, trong đó ít nhất hai đứt gãy sợi kép được tạo ra, việc sửa chữa đứt gãy sợi kép có thể bao gồm việc loại bỏ chất liệu nằm giữa các đứt gãy sợi kép, thay thế nó bằng trình tự thể cho để thay thế các trình tự nằm giữa các đứt gãy sợi kép bằng trình tự thể cho này. Theo các phương án khác, trình tự được loại bỏ có thể chứa, không mang tính giới hạn, trình tự mã hoá tất cả hoặc một phần trình tự nucleotit mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án tiếp theo, trình tự được loại bỏ này có thể chứa, không mang tính giới hạn, các trình tự điều hoà gây ảnh hưởng đến biểu hiện của protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án như vậy, biểu hiện của protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất bị giảm đi so với mức biểu hiện trước khi phân cắt.

Theo các phương án trong đó một đứt gãy sợi kép được tạo ra, việc sửa chữa đứt gãy sợi kép có thể bao gồm việc cài xen trình tự thể cho vào hoặc xuyên từ bên này sang bên kia đứt gãy sợi kép. Theo một số phương án, trình tự thể cho có thể được cài xen vào trình tự mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án, việc cài xen trình tự như vậy có thể làm gián đoạn sự phiên mã của trình tự mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất thông qua, bằng cách ví dụ không mang tính giới hạn, với sự có mặt của codon kết thúc gắn vào khung. Theo các phương án tiếp theo, thể cho, không mang tính hạn chế, có thể phá vỡ chức năng của các trình tự điều hoà gây ảnh hưởng đến biểu hiện của protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất. Theo các phương án, biểu hiện của protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất bị giảm đi so với mức biểu hiện trước khi phân cắt.

Theo các phương án khác nữa, trình tự thể cho có thể mã hoá protein quan tâm. Theo các phương án tiếp theo, biểu hiện của protein quan tâm từ trình tự thể cho có thể được khống chế, được điều hoà bởi, hoặc liên kết có điều khiển với các trình tự điều hoà có mặt trong trình tự thể cho và/hoặc trình tự điều hoà có mặt trong trình tự mà trình tự thể cho được cài xen vào. Theo các phương án bổ sung, trình tự axit nucleic mã hoá protein quan tâm có thể được đưa vào tế bào riêng biệt với hoặc cùng với trình tự thể cho. Theo một số phương án, trình tự thể cho có thể được chứa trong cùng một phân tử

axit nucleic như là trình tự mã hoá protein quan tâm.

Theo các phương án khác, trình tự nucleotit mã hoá trình tự nucleotit protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất mã hoá protein được biểu hiện cao, cao hơn, rất cao, hoặc cao nhất có thể nằm trong, bằng ví dụ không mang tính giới hạn, hệ gen, plasmit, cosmit, nhiễm sắc thể nhân tạo, thể bổ sung, hoặc cấu trúc nucleotit khác trong tế bào.

Việc thực hiện các phương pháp này, cũng như việc điều chế và sử dụng chế phẩm được bộc lộ trong bản mô tả này, trừ khi được quy định khác đi, sử dụng các kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực sinh học phân tử, hoá sinh, cấu trúc và phân tích chất nhiễm sắc, hoá tin, nuôi cấy tế bào, ADN tái tổ hợp và các lĩnh vực liên quan là nằm trong kiến thức trong lĩnh vực chuyên ngành. Các kỹ thuật này được mô tả chi tiết trong tài liệu. Tham khảo, ví dụ, Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001; Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates; the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P. M. Wassarman and A. P. Wolfe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; và METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P. B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Chuyển vận axit nucleic đến tế bào thực vật

Như đã nêu trên, có thể đưa cấu trúc ADN vào (ví dụ, vào hệ gen của) cơ thể chủ thực vật mong muốn theo hàng loạt các kỹ thuật thông thường. Để xem các kỹ thuật như vậy tham khảo, ví dụ, Weissbach & Weissbach Methods for Plant Molecular Biology (1988, Academic Press, N. Y.) Section VIII, pp. 42 1-463; và Grierson & Corey, Plant Molecular Biology (1988, 2d Ed.), Blackie, London, Ch. 7-9.

Ví dụ, cấu trúc ADN có thể được đưa trực tiếp vào ADN hệ gen của tế bào thực vật bằng cách sử dụng các kỹ thuật như đục lỗ điện và sự tiêm tế bào các thể nguyên sinh tế bào thực vật, hoặc có thể đưa trực tiếp các cấu trúc ADN vào mô thực vật bằng cách sử dụng phương pháp chuyển gen dùng súng bắn gen, như kỹ thuật bắn phá bằng hạt ADN (tham khảo ví dụ ấn phẩm Klein *et al* (1987) *Nature* 327:70-73). Theo cách khác, các cấu trúc ADN có thể được kết hợp với vùng nằm bên sườn T-ADN thích hợp và đưa vào vector cơ thể chủ *Agrobacterium tumefaciens* thông thường. Các kỹ thuật chuyển nhiễm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*, bao gồm kỹ thuật disarming và sử dụng vector kép, đã được mô tả rõ trong lĩnh vực chuyên ngành. Tham khảo, ví dụ Horsch *et al* (1984) *Science* 233:496- 498, và Fraley *et al* (1983) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80:4803.

Ngoài ra, có thể thực hiện sự chuyển gen sử dụng vi khuẩn hoặc virus không phải là *Agrobacterium* như *Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, virus X cây khoai tây, virus bệnh khảm hoa lơ và virus khảm gân lá sắn và/hoặc virus khảm cây thuốc lá, tham khảo ví dụ ấn phẩm Chung *et al.* (2006) *Trends Plant Sci.* 11(1): 1-4.

Ngoài ra, có thể dùng peptit thâm nhập tế bào dung hợp với hạt nano hoặc nucleaza đặc hiệu trình tự để chuyển vận nucleotit hoặc trình tự protein vào tế bào thực vật. Peptit thâm nhập tế bào có thể được biểu hiện, được phân lập, và được chức hoá với hạt nano, trình tự nucleotit, hoặc protein để chuyển vận trong các tế bào thực vật. Peptit thâm nhập tế bào có khả năng chuyển vận chức năng các phân tử vào tế bào thực vật đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: TAT (Chugh *et al*, (2008) *FEBS* 275: 2403-2414); R9 (Chang *et al* (2005) *Plant Cell Physiol* 46(3): 482-488 and Chen *et al* (2007) *FEBS Lett* 581(9): 1891-1897); MPG (Ziegler *et al* (2008) *Adv Drug Deliver Rev* 6: 580-597 and Morris *et al* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 2730-2736); PEP1 (Henriques *et al* (2005) *Biochemistry-US* 44(3): 10189 - 10198); và peptit thâm nhập tế bào có nguồn gốc từ thực vật.

Chức năng độc hại của cơ thể chủ *Agrobacterium tumefaciens* sẽ hướng đoạn xen

của cấu trúc và gen đánh dấu kề cận vào ADN tế bào thực vật khi tế bào này được gây nhiễm bằng vi khuẩn bằng cách sử dụng vector T ADN kép (Bevan (1984) *Nuc. Acid Res.* 12:8711-8721) hoặc quá trình đồng nuôi cấy (Horsch et al (1985) *Science* 227:1229-1231). Thông thường, hệ chuyển nhiễm *Agrobacterium* được sử dụng để điều khiển thực vật hai lá mầm Bevan et al (1982) *Ann. Rev. Genet* 16:357-384; Rogers et al (1986) *Methods Enzymol.* 118:627-641). Hệ chuyển nhiễm *Agrobacterium* cũng có thể được dùng để biến nạp, cũng như chuyển, ADN vào thực vật một lá mầm và các tế bào thực vật. Tham khảo patent Mỹ số 5,591,616; Hemalsteen et al (1984) *EMBO J* 3:3039-3041; Hooykass-Van Slogteren et al (1984) *Nature* 311 : 763-764; Grimsley et al (1987) *Nature* 325: 1677-179; Boulton et al (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:3 1-40. ; và Gould et al (1991) *Plant Physiol.* 95:426-434.

Phương pháp chuyển gen và phương pháp chuyển nhiễm khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, chuyển nhiễm thể nguyên sinh thông qua hấp thu ADN trần qua trung gian canxi, polyetylen glycol (PEG) hoặc đục lỗ điện (tham khảo Paszkowski et al. (1984) *EMBO J* 3:2717-2722, Potrykus et al. (1985) *Molec. Gen. Genet.* 199: 169-177; From et al. (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828; và Shimamoto (1989) *Nature* 338: 274-276) và đục lỗ điện mô thực vật (D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4: 1495- 1505). Các phương pháp bổ sung để chuyển nhiễm tế bào thực vật bao gồm sự tiêm tế bào, hấp thu ADN qua trung gian silicon carbua (Kaepler et al. (1990) *Plant Cell Reporter* 9:415-418), và phương pháp bắn gen (microprojectile bombardment) (xem Klein et al. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309; and Gordon-Kim et al. (1990) *Plant Cell* 2: 603-618).

Phương pháp và thành phần được bộc lộ có thể được sử dụng để cài xen trình tự ngoại sinh vào vị trí định trước trong hệ gen tế bào thực vật. Điều này là hữu ích vì biểu hiện gen chuyển được đưa vào hệ gen thực vật phụ thuộc nhiều vào vị trí hợp nhất. Theo đó, gen mã hoá, ví dụ, các chất dinh dưỡng, chất kháng sinh hoặc các phân tử trị liệu có thể được cài xen, bằng phương pháp tái tổ hợp hướng đích, vào vùng hệ gen thực vật thuận lợi cho biểu hiện chúng.

Các tế bào thực vật được chuyển nhiễm được tạo ra bằng các kỹ thuật chuyển nhiễm bất kỳ nêu trên có thể được nuôi cấy để tạo ra thực vật hoàn chỉnh có gây nhiễm có kiểu gen được chuyển nhiễm và do đó có kiểu hình mong muốn. Các kỹ thuật tái tạo như vậy phụ thuộc vào việc xử lý các hormon thực vật nhất định trong môi trường sinh trưởng nuôi cấy mô, thường là phụ thuộc vào gen đánh dấu diệt sinh vật và/hoặc chất diệt cỏ đã được đưa vào cùng với trình tự nucleotit mong muốn. Quá trình tái sinh thực vật từ các thể nguyên sinh được nuôi cấy được mô tả trong Evans, *et al.*, "Protoplasts Isolation and Culture" in Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, Macmillian Publishing Company, New York, 1983; and Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. Cũng có thể thu được quá trình tái sinh từ thể chai thực vật, mảnh cây, cơ quan, hạt phấn, phôi hoặc các phần của chúng. Các kỹ thuật tái tạo như vậy được mô tả tổng quát trong Klee *et al* (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486.

Các axit nucleic được đưa vào tế bào thực vật có thể được sử dụng để mang lại các tính trạng mong muốn trên về cơ bản thực vật bất kỳ. Nhiều thực vật và hệ thống tế bào thực vật có thể được điều khiển để cho các đặc tính sinh lý và nông học mong muốn được mô tả trong bản mô tả này bằng cách sử dụng cấu trúc axit nucleic của bản mô tả này và các phương pháp chuyển nhiễm khác nhau được đề cập nêu trên. Theo các phương án được ưu tiên, thực vật và tế bào thực vật đích hoặc quá trình điều khiển bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số thực vật một lá mầm và hai lá mầm, như các cây trồng cơ bản bao gồm các cây cho hạt (ví dụ, lúa mì, ngô, lúa, kê, lúa mạch), cây cho quả (ví dụ, cà chua, táo, lê, dâu tây, màu da cam), cây thức ăn cho súc vật (ví dụ, cỏ linh lăng), các loại rau ăn rễ (ví dụ, cây cà rốt, khoai tây, củ cải đường, khoai mỡ), cây trồng ăn lá (ví dụ, rau diếp, rau bina, cải bắp); thực vật cho hoa (ví dụ, cây thuốc lá cảnh, hoa hồng, cây hoa cúc), cây thuộc loại tùng bách và cây kim (ví dụ, cây thông, cây vân sam); thực vật được sử dụng trong công nghệ thực vật xử lý môi trường (ví dụ, thực vật thu kim loại nặng); cây trồng cho dầu (ví dụ, cây hướng dương, nho, đậu nành, cây cọ) và thực vật được sử dụng cho các mục đích thử nghiệm (ví dụ, *Arabidopsis*). Do đó, phương pháp và thành phần được bộc lộ có thể sử dụng cho nhiều thực vật, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn

trong số, loài thuộc giống *Asparagus*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Glycine*, *Gossypium*, *Hordeum*, *Lactuca*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Nicotiana*, *Oryza*, *Persea*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Secale*, *Solanum*, *Sorghum*, *Triticum*, *Vitis*, *Vigna*, và *Zea*.

Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận biết được rằng sau khi caxet biểu hiện được kết hợp ổn định vào thực vật chuyển gen và được khẳng định là có thể hoạt động, thì caxet này có thể được đưa vào thực vật khác bằng cách lai hữu tính. Có thể sử dụng kỹ thuật bất kỳ trong một số kỹ thuật nhân giống tiêu chuẩn, tùy thuộc vào loài sẽ được lai.

Tế bào thực vật, thể chai, mô hoặc thực vật được chuyển nhiễm có thể được nhận diện và phân lập bằng cách chọn lọc hoặc sàng lọc chất liệu thực vật được điều khiển cho các tính trạng được mã hoá bởi bởi gen đánh dấu có mặt trên ADN chuyển nhiễm. Chẳng hạn, có thể thực hiện quá trình lựa chọn bằng cách nuôi chất liệu thực vật được điều khiển trên môi trường chứa một lượng có tác dụng ức chế của chất kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ mà cấu trúc gen chuyển nhiễm có tính đề kháng với nó. Ngoài ra, thực vật và các tế bào thực vật được gây nhiễm cũng có thể được nhận diện bằng cách sàng lọc cho hoạt tính cho gen đánh dấu nhìn được bất kỳ (ví dụ, gen *õ-glucuronidaza*, *luxiferaza*, B hoặc C1) mà có thể có mặt trên cấu trúc axit nucleic tái tổ hợp. Các phương pháp chọn lọc và sàng lọc như vậy là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Cũng có thể sử dụng các phương pháp vật lý và sinh hoá để nhận diện thể chuyển nhiễm thực vật hoặc tế bào thực vật chứa cấu trúc gen được cài xen. Các phương pháp này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn trong số các phương pháp: 1) phân tích thẩm Nam hoặc khuếch đại PCR để phát hiện và xác định cấu trúc của đoạn xen ADN tái tổ hợp; 2) phương pháp thẩm Bắc, kéo dài đoạn mồi hoặc enzym phiên mã ngược-khuếch đại PCR để phát hiện và kiểm tra sản phẩm phiên mã khuôn ARN của cấu trúc gen; 3) thử nghiệm enzym để phát hiện hoạt tính enzym hoặc ribozym, trong đó các sản phẩm gen như vậy được mã hoá bởi bởi cấu trúc gen; 4) điện di trên gel protein, các kỹ thuật thẩm

Tây, kết tủa miễn dịch, hoặc thử nghiệm hấp phụ gắn enzym, trong đó các sản phẩm cấu trúc gen là protein; 5) phương pháp phát hiện đa hình đơn nucleotit, thử nghiệm xâm lấn (invader assay), kỹ thuật giải trình tự pyrosequencing (là kỹ thuật cho phép giải trình tự các chuỗi gen ADN với chi phí thấp hơn theo cách truyền thống), phương pháp giải trình tự solexa. Cũng có thể sử dụng các kỹ thuật bổ sung, như lai *in situ*, nhuộm màu enzym, và nhuộm màu miễn dịch, để phát hiện sự có mặt hoặc biểu hiện của cấu trúc tái tổ hợp trong cơ quan và các mô thực vật cụ thể. Phương pháp tiến hành tất cả các thử nghiệm này là đã biết đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Hiệu quả của việc xử lý gen bằng cách sử dụng các phương pháp được bộc lộ trong bản mô tả này có thể được đánh giá, ví dụ, bằng phương pháp thăm bắc ARN (ví dụ, ARN thông tin) được phân lập từ mô quan tâm. Thông thường, nếu lượng ARN thông tin tăng lên, có thể cho rằng gen nội sinh tương ứng được biểu hiện với mức độ lớn hơn trước đây. Có thể sử dụng các phương pháp đo hoạt tính gen khác. Có thể sử dụng các dạng thử nghiệm enzym khác nhau, tùy thuộc vào chất nền được sử dụng và phương pháp phát hiện sự gia tăng hoặc sự giảm của sản phẩm hoặc sản phẩm phụ phản ứng. Ngoài ra, có thể đo mức protein được biểu hiện bằng phương pháp miễn dịch hoá học, tức là phương pháp ELISA, RIA, EIA và các thử nghiệm trên cơ sở kháng thể khác đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, như các thử nghiệm phát hiện bằng phương pháp điện di (bằng phương pháp nhuộm màu hoặc phân tích thẩm tách Tây). Gen chuyển có thể được biểu hiện chọn lọc trong một số mô của thực vật hoặc ở một số giai đoạn phát triển, hoặc gen chuyển này có thể được biểu hiện hầu như trong tất cả mô thực vật, hầu như trong toàn bộ chu trình sống. Tuy nhiên, bất kỳ phương thức biểu hiện tổ hợp bất kỳ cũng có thể được áp dụng.

Sáng chế này cũng đề cập đến hạt giống của thực vật chuyển gen được nêu trên trong đó hạt này có gen chuyển hoặc cấu trúc gen. Sáng chế này cũng bao gồm thể hệ con, dòng vô tính, dòng tế bào hoặc tế bào của thực vật chuyển gen đã nêu trên trong đó thể hệ con, dòng vô tính, dòng tế bào hoặc tế bào này có gen chuyển hoặc cấu trúc gen.

Ứng dụng

Có thể sử dụng phương pháp và thành phần được bộc lộ cho sự phân cắt hướng đích để gây ra đột biến trong trình tự hệ gen. Sự phân cắt hướng đích cũng có thể được dùng để tạo ra gen bất hoạt (knock-out) hoặc gen bị ức chế (knock-down) (ví dụ, hệ gen chức năng hoặc xác nhận đích) và để tạo thuận lợi cho sự cài xen hướng đích của trình tự vào hệ gen (tức là trình tự thay thế). Sự cài xen có thể dựa vào sự thay thế trình tự nhiễm sắc thể thông qua, như là ví dụ không mang tính giới hạn, tái tổ hợp tương đồng hoặc bằng cách hợp nhất hướng đích, trong đó trình tự mới (tức là trình tự không có mặt ở vùng quan tâm) được cài xen vào một vị trí đích định trước. Trong một số ví dụ, các trình tự mới như vậy có thể nằm bên sườn các trình tự tương đồng với vùng quan tâm ở trong nhiễm sắc thể. Các phương pháp này cũng có thể được dùng để thay thế trình tự kiểu dại bằng trình tự đột biến hoặc để chuyển hoá một alen thành alen khác.

Cũng có thể áp dụng sự phân cắt hướng đích các tác nhân gây bệnh thực vật gây nhiễm hoặc được hợp nhất để điều trị sự nhiễm tác nhân gây bệnh ở cơ thể chủ thực vật, ví dụ, bằng cách phân cắt hệ gen của sinh bệnh sao cho khả năng gây bệnh của nó được giảm đi hoặc loại trừ. Ngoài ra, sự phân cắt hướng đích của gen mã hoá các thụ thể cho virus thực vật có thể được sử dụng phong bế biểu hiện của các thụ thể như vậy, nhờ đó ngăn ngừa sự nhiễm virus và/hoặc sự lan tràn virus ở thực vật này.

Các tác nhân gây bệnh thực vật ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số virus thực vật như virus *Alfarnovirus*, *Alphacryptovirus*, *Badnavirus*, *Betacyptovirus*, *Bigeminivirus*, *Bromovirus*, *Bymovirus*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Carrnovirus*, *Caulimovirus*, *Closterovirus*, *Comovirus*, *Cucurnovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Dianthovirus*, *Enamovirus*, *Fabavirus*, *Fijivirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Hybrigeminivirus*, *Idaeovirus*, *Ilawirus*, *Ipomovirus*, *Luteovirus*, *Machlomovirus*, *Macluravirus*, virus *Mara*, *Monogeminivirus*, *Nanavirus*, *Necrovirus*, *Nepovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Oryzavirus*, *Ourmiavirus*, *Phytoreovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, *satellite WAS*, *satellivirus*, *Sequivirus*, *Sobemovirus*, *Tenuivirus*, *Tobamovirus*, *Tobraviruses*,

Tornbusvirus, *Tospovirus*, *Trichovirus*, *Tymovirus*, *Umbravirus*, *Varicosavirus* và *Waikavirus*; các nấm gây bệnh như nấm gây bệnh than (ví dụ *Ustilaginales*), bệnh rỉ sắt (*Uredinales*), bệnh nấm gây cựa lúa mạch (*Claviceps purpurea*) và bệnh nấm mốc sương; bệnh mốc (Oomycetes) như *Phytophthora infestans* (bệnh thối khoai tây); các vi khuẩn gây bệnh như *Erwinia* (ví dụ, *E. herbicola*), *Pseudomonas* (ví dụ, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. fluorescens* và *P. putida*), *Ralstonia* (ví dụ, *R. solanacearum*), *Agrobacterium* và *Xanthomonas*; roundworms (*Nematoda*); và *Phytophthora* (*Phytophthora* và *Plasmodiophora*).

Các phương pháp sản xuất tái tổ hợp hướng đích protein quan tâm được bộc lộ có thể được sử dụng để thay thế trình tự hệ gen bất kỳ bằng trình tự không đồng nhất. Ví dụ, có thể thay trình tự hệ gen đột biến bằng thành phần kiểu đại của nó, nhờ đó đưa ra phương pháp điều trị các bệnh cho thực vật; tạo ra tính đề kháng với các tác nhân gây bệnh thực vật; gia tăng hiệu suất cây trồng, v. v. Theo cách tương tự, có thể thay một alen của gen bằng alen khác bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp hướng đích được bộc lộ trong bản mô tả này.

Trong nhiều trường hợp này, vùng quan tâm chứa đột biến, và polynucleotit thể cho chứa trình tự kiểu đại tương ứng. Tương tự, trình tự hệ gen kiểu đại có thể được thay bằng trình tự đột biến, nếu muốn. Ví dụ, biểu hiện quá mức của gen gây ung thư có thể được đảo ngược hoặc bằng cách gây đột biến gen hoặc bằng cách thay thế trình tự kiểm soát nó bằng trình tự trợ giúp mức biểu hiện thấp hơn, không gây bệnh. Thật ra, một bệnh học bất kỳ phụ thuộc vào trình tự hệ gen nhất định, theo bất kỳ cách nào, có thể được điều chỉnh hoặc làm thuyên giảm bằng cách sử dụng phương pháp và thành phần được bộc lộ trong bản mô tả này.

Sự phân cắt, sự cài xen, cắt, và/hoặc tái tổ hợp hướng đích cũng có thể được dùng để biến đổi các trình tự không mã hoá (ví dụ, các trình tự điều hoà như gen khởi đầu, gen tăng cường, các chất khởi mào, gen kết thúc, vị trí phân cắt) để biến đổi mức biểu hiện

của sản phẩm gen. Các phương pháp như vậy có thể được dùng, ví dụ, cho các mục đích trị liệu, các nghiên cứu hệ gen chức năng và/hoặc hợp thức hóa đích.

Sự cải biến hướng đích cấu trúc chất nhiễm sắc có thể được sử dụng để tạo thuận lợi cho sự gắn kết của protein dung hợp với chất nhiễm sắc tế bào. Theo các phương án bổ sung, có thể sử dụng một hoặc nhiều liên hợp giữa miền gắn kết ngón tay kẽm và recombinaza (hoặc đoạn chức năng của nó), bổ sung hoặc thay thế cho liên hợp ngón tay kẽm-miền phân cắt được bộc lộ trong bản mô tả này, để tạo thuận lợi cho tái tổ hợp hướng đích. Tham khảo, ví dụ, Patent Mỹ số 6,534,261 và Akopian *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8688-8691. Theo các phương án bổ sung, các phương pháp và thành phần được bộc lộ được sử dụng để tạo ra liên hợp của miền gắn kết ZFP với miền hoạt hoá hoặc ức chế phiên mã mà đòi hỏi quá trình dime hóa (hoặc homodime hoặc heterodime hóa) cho hoạt tính của chúng. Trong các trường hợp này, polypeptit liên hợp chứa miền gắn kết ngón tay kẽm và miền monome chức năng (ví dụ, monome từ miền hoạt hoá hoặc ức chế phiên mã dime). Sự gắn kết của hai polypeptit liên hợp như vậy với vị trí đích nằm đúng vị trí cho phép diễn ra quá trình dime hóa để tái tạo lại miền hoạt hoá hoặc ức chế phiên mã chức năng.

Ngoài ra, như được bộc lộ trên đây, các phương pháp và thành phần được nêu ra trong bản mô tả này có thể được sử dụng cho sự hợp nhất hướng đích trình tự ngoại sinh vào vùng quan tâm trong hệ gen tế bào, ví dụ trong đó sự phân cắt làm tăng sự cài xen thông qua cơ chế phụ thuộc tính tương đồng (ví dụ, cài xen trình tự thể cho chứa trình tự ngoại sinh cùng với một hoặc nhiều trình tự là đồng nhất, hoặc tương đồng nhưng không phải là đồng nhất, với trình tự hệ gen định trước (tức là vị trí đích)).

Trình tự thể cho có thể có đủ tính tương đồng ở vùng nằm bên sườn trình tự ngoại sinh để hỗ trợ cho sự sửa chữa dựa vào tính tương đồng của đứt gãy sợi đôi trong trình tự hệ gen, nhờ đó cài xen trình tự ngoại sinh ở vị trí đích hệ gen. Do đó, axit nucleic thể cho có thể có kích cỡ bất kỳ đủ để hỗ trợ cho sự hợp nhất của trình tự ngoại sinh bằng cơ chế sửa chữa phụ thuộc tính tương đồng (ví dụ, tái tổ hợp tương đồng). Không muốn bị ràng

buộc bởi lý thuyết bất kỳ, vùng tương đồng nằm bên sườn trình tự ngoại sinh được cho là tạo ra đầu mút nhiễm sắc thể đứt gãy với khuôn mẫu để tái tổng hợp thông tin di truyền ở vị trí đứt gãy sợi kép. Theo một số phương án, hai trình tự đồng nhất hoặc hai trình tự tương đồng nhưng không đồng nhất (hoặc một trong mỗi loại) có mặt, nằm bên sườn the trình tự ngoại sinh. Trình tự ngoại sinh (hoặc axit nucleic ngoại sinh hoặc polynucleotit ngoại sinh) là trình tự chứa trình tự nucleotit thường không có mặt ở vùng quan tâm.

Các trình tự ngoại sinh ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số ADN bổ trợ, trình tự khởi đầu, trình tự tăng cường, thẻ biểu vị, gen đánh dấu, vị trí nhận biết enzym phân cắt và các dạng cấu trúc biểu hiện khác nhau. Tham khảo, ví dụ, patent Mỹ số 6,833,252. Các endonucleaza vị trí nguồn ví dụ bổ sung bao gồm I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, ICreI, I-TevI, I-TevII và I-TaiIII. Các trình tự nhận biết chúng đã được biết đến. Tham khảo patent Mỹ số 5,420,032; Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon *et al.* (1989) *Gene* 82:115-118; Perler *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1 125-1 127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble *et al.* (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 và New England Biolabs catalogue.

Các gen đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số các trình tự mã hoá protein that làm trung gian tính đề kháng chất kháng sinh (ví dụ, tính đề kháng ampicilin, tính đề kháng neomycin, tính đề kháng G418, tính đề kháng puromycin), trình tự mã hoá protein có màu hoặc phát huỳnh quang hoặc phát quang (ví dụ, protein huỳnh quang màu xanh lá cây, protein huỳnh quang xanh lá cây đậm, protein huỳnh quang đỏ, luxiferaza), và các protein làm trung gian sự tăng sinh trưởng tế bào và/hoặc khuếch đại gen (ví dụ, reductaza dihydrofolat). Do đó, các gen đánh dấu ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số ò-glucuronidaza (GUS), transferaza phosphinothricin N-axetyl (PAT, BAR), neomycin phosphotransferaza, p-lactamaza, catechol dioxyaza, a-amylaza, tyrosinaza, P-galactosidaza, luxiferaza, aequorin, synthaza EPSP, nitrilaza, synthaza axetolactat (ALS - acetolactate synthase), reductaza dihydrofolat (DHFR - dihydrofolate reductase), dehalogenaza dalapon và synthaza antranilat. Theo một số phương án, sự hợp

nhất hướng đích được sử dụng để cài xen cấu trúc biểu hiện ARN, ví dụ, trình tự chịu trách nhiệm cho sự biểu hiện có điều hoà của micro ARN hoặc siARN. Các gen khởi đầu, gen tăng cường và trình tự điều hoà phiên mã bổ sung, như đã nêu trên, cũng có thể được kết hợp vào cấu trúc biểu hiện ARN.

Sự biến nạp thông thường sử dụng sự hợp nhất ngẫu nhiên ADN lạ để tạo ra cây trồng chuyển gen được cải biến với tính trạng lựa chọn chịu hạn chế ngặt nghèo ở một số thị trường nước ngoài. Ngoài ra, đầu ra ngoài mong muốn cũng xuất phát từ phương pháp đưa ADN vào hoặc từ sự cài xen ngẫu nhiên gen chuyển vào vùng nhạy của hệ gen, thường là nhiều lần cho mỗi hệ gen. Đặc biệt là, tác động của sự cài xen không chính xác có thể không tự biểu hiện trong các thể hệ ban đầu cơ chế kiểm tra sai sót ADN khác nhau được hoạt hoá trong quá trình phát triển, tái sinh, sản sinh phôi, và sự phát triển. Các yếu tố đầu ra này ảnh hưởng đến thời gian và chi phí cho chương trình chuyển gen bất kỳ trong lĩnh vực công nghệ sinh học cho nông nghiệp. Tuy nhiên, theo sáng chế gần đây của Dow AgroSciences (WO/2008/021207), có mô tả phương pháp cài xen chính xác các gen chuyển thông qua tái tổ hợp tương đồng qua trung gian enzym ZFN (nucleaza ngón tay kẽm) (ZFN). Tuy nhiên ngược lại, khi mà protein ZFN có thể được biểu hiện và tinh chế bên ngoài sinh vật đích và sau đó được chuyển vận vào tế bào thực vật đích, đột biến đặc hiệu phẫu thuật/gen nốc ao (knock-out) có thể đưa vào thông qua kết nối đầu cuối không tương đồng (NHEJ - non-homologous end joining). Do đó, sáng chế có thể tạo ra thực vật được cải biến di truyền không chuyển gen mà sẽ vòng tránh được sự hạn chế dùng cây trồng chuyển gen crops và có thể có quá trình sửa chữa gen hướng đích mà không đòi hỏi phương pháp chuyển gen.

Phương pháp biểu hiện khác loài protein nucleaza đặc hiệu trình tự, như protein ZFN, là đã biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các hệ thống biểu hiện có thể áp dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở: việc sử dụng hệ *in vitro* như hệ thống không chứa tế bào mầm lúa mì (tham khảo patent Mỹ số 7,235,382, được kết hợp theo cách việc dẫn vào bản mô tả này); hệ thống biểu hiện *Pseudomonas fluorescens* (Madduri *et al.* , (2007) *Protein Express Purif*, 55(2): 352-360); và hệ thống biểu hiện protein *Pichia* (tham khảo

các patent Mỹ số 4,683,293; 4,808,537; 4,812,405; 4,818,700; 4,837,148; 4,855,231; 4,857,467; 4,879,231; 4,882,279; 4,885,242; 4,895,800; 4,929,555; 5,002,876; 5,004,688; 5,032,516; 5,122,465; 5,135,868; 5,166,329, được kết hợp theo cách việc dẫn vào bản mô tả này).

Các phương án cụ thể của sáng chế bao gồm ZFN chức năng được biểu hiện ngoại sinh được liên hợp với hạt nano (NP) và được chuyển vận bằng phương pháp chuyển vận nhẹ nhàng và thông minh qua trung gian NP vào các tế bào thực vật nguyên vẹn để cảm ứng sự đứt gãy sợi kép và phục hồi chức năng của gen bị phá vỡ bằng NHEJ. Theo các phương án khác, ZFN chức năng đã liên hợp với NP được chuyển vận cùng với mảnh ADN thể cho bằng phương pháp chuyển vận nhẹ nhàng và thông minh qua trung gian NP, trong đó ZFN phân cắt trình tự cụ thể trong hệ gen và ADN thể cho được hợp nhất vào locus này thông qua tái tổ hợp tương đồng. Các phương pháp gắn kết protein với NP được thực hiện theo bốn phương pháp chính (1) hấp phụ tĩnh điện, (2) liên hợp với phối tử trên bề mặt NP, (3) liên hợp với phân tử đồng nhân tố nhỏ mà protein có thể nhận biết và gắn kết, và (4) liên hợp trực tiếp với bề mặt NP (Aubin-Tam và Hamad-Schifferli, 2008). Các phương pháp khác được mô tả trong tài liệu: Medintz et al. Các vấn đề liên quan đến các phương pháp đánh dấu này bao gồm sự bố trí các nguyên tử trong không gian, hoặc liệu protein có thể 'chuyển qua' phối tử đến bề mặt NP hoặc nhóm liên kết liên quan. Việc lựa chọn các hóa chất tạo ra mối liên kết đặc hiệu (tức là không gây ra liên kết chéo trên phạm vi rộng) và là ổn định cho mục đích mong muốn cũng là xem xét cần thiết. ZFN peptit cần phải được chức hoá ở nồng độ DDT cao và trong sự có mặt của ion kẽm. Để giữ độ ổn định của thể liên hợp, sự bổ sung nhóm chức sẽ được thực hiện theo quy trình liên hợp được mô tả trong ấn phẩm: Oh et. al. , 2010.

Sáng chế sẽ được mô tả thêm dựa vào các ví dụ có tính chất minh hoạ sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tạo ra nucleaza đặc hiệu trình tự (SSN) thông qua sự dịch mã *in vitro* hoặc biểu hiện trên vi khuẩn.

Các SSN (IL1-LO/FokI, IL1-43/FokI, IL1-8/FokI và I-SceI) được điều khiển và được khuếch đại PCR từ các plasmit chứa SSN, gắn các vị trí enzym giới hạn và 6x nhân histidin. Sản phẩm PCR được cài xen vào vector TOPO pCR2.1 để nhân dòng và tạo trình tự. Các mảnh gen chứa trình tự mã hoá SSN được loại ra khỏi plasmit thông qua sự phân cắt hạn chế và được gắn vào vị trí hạn chế tương thích của vector biểu hiện pET15b. Các mẫu này được biến nạp vào các tế bào *E. coli* khả biến biểu hiện BL21 cùng với pDAB4883. Để cho biểu hiện hữu hiệu, sự phá hủy protein SSN được giảm đi trong ADN *E. coli* BL21 bằng cách biến nạp BL21 bằng plasmit pDAB4883 gồm có plasmit biểu hiện pCOT4 chứa gen ligaza nằm sau gen khởi đầu mà cũng được cảm ứng bởi IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosit). Quá trình này giúp sửa chữa phá hủy bất kỳ được thực hiện bởi SSN đến hệ gen của tế bào BL21 trong quá trình biểu hiện quá mức.

Cấu trúc ligaza gen-pCOT4 và các cấu trúc SSN-pET15b được đồng biến nạp vào cùng tế bào biểu hiện BL21. Nuôi cấy của BL21 chuyển gen được nuôi trong 50ml môi trường LB có chloramphenicol, carbenicillin, và $ZnCl_2$ và được ủ ở nhiệt độ 37°C cho đến khi OD_{600nm} đạt đến 0,5. Gây ra biểu hiện bằng IPTG (0,1-0,7 mM) ở các nồng độ khác nhau, ủ ở các nhiệt độ khác nhau (16-28°C) và phân tích bằng SDS-PAGE và phương pháp thấm Tây để phát hiện sự có mặt của protein SSN. Do đó, IL1-LO/FokI, IL1-43/FokI, IL1-8/FokI và I-SceI được biểu hiện trong các tế bào *E. coli* và được tinh chế bằng Ni-NTA. Sau khi tinh chế, chức năng SSN được chứng tỏ dựa trên khả năng giải phóng mảnh đặc hiệu từ plasmit biểu hiện.

Theo cách khác, các nucleaza đặc hiệu trình tự được biểu hiện thông qua sự dịch mã *in vitro*. Kit thương mại, TNT®, từ Promega là quy trình hiệu quả và tiện lợi cho biểu hiện protein. Các plasmit vòng chứa gen nucleaza đặc hiệu trình tự được nhân dòng ở phía sau từ gen khởi đầu polymeaza ARN T7 hoặc SP6 được biểu hiện *in vitro* bằng enzym biểu hiện protein được cấp trong kit này. Các protein tổng hợp tạo ra trong 50 µl

dung dịch phản ứng trong 60 - 90 phút theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Các kit thương mại bổ sung là đã có sẵn cho sự dịch mã thành protein *in vitro*, các kit bổ sung mà có thể được sử dụng bao gồm: ActivePro™ từ Ambion, PROTEINscript™ II từ Ambion, PURExpress™ từ New England Biolabs, ngoài ra là các kit có sẵn trên thị trường khác.

Các Fig. 1 và 2 thể hiện biểu hiện trong *E. coli* của SSN được gắn đuôi histidin (1) và được gắn đuôi phi histidin (2), ZFN-IL1FokI. ZFN-IL1FokI được biểu hiện *in vitro* giải phóng mảnh nằm bên sườn vị trí gắn kết ZFN được định rõ từ plasmit này. Do đó, cả SSN được biểu hiện trong *E. coli* và *in vitro* là hữu ích cho sự phân cắt hiệu quả và đặc hiệu các phân tử ADN đích, và các SSN này được sử dụng thay cho nhau trong suốt khảo sát này.

Các protein được biểu hiện từ các gen SSN được tách dòng tỏ ra là có chức năng (tức là trong quá trình phân cắt ADN thể cho). Ví dụ, plasmit pDAB1585 (được thể hiện ở Fig. 4) được xử lý bằng ZFN-IL1FokI. ADN plasmit được phân cắt này có mạch thẳng. Sau đó, mảnh thẳng từ plasmit được phân cắt bằng ZFN-IL1FokI này được tinh chế khỏi gel và được tự nối ghép bằng cách sử dụng quy trình nối *in vitro* qua đêm. Sản phẩm nối ghép này được đưa vào các tế bào *E. coli* DH5 α khả biến bằng hoá học. Một số khuẩn lạc tái tổ hợp được thu gom và được phân tích bằng cả phân tích kiểu mẫu hạn chế và tạo trình tự ADN, cho thấy là pDAB1585 phân cắt như dự tính.

Ví dụ 2 — Tạo ra nuôi cấy tế bào đích bằng vị trí gắn kết SSN nằm bên sườn mảnh gen thông báo GFP.

Các trình tự đích bao gồm hai mảnh gen protein huỳnh quang xanh lá cây (*gfp* - Green Fluorescent Protein) (Evrogen Joint Stock Company, Moscow, Russia) nằm bên sườn caxet biểu hiện α -glucuronidaza (*uidA*). Trong một cấu trúc đích, vị trí gắn kết với ZFN với trình tự nhận biết bao gồm các đoạn lặp đảo mà protein dung hợp ngón tay kẽm-FokI có thể gắn kết với như là các homodime (Fig. 3) được hợp nhất vào cấu trúc đích. Vị trí gắn kết này chứa bốn đoạn lặp thể nối tiếp của trình tự nhận biết của protein dung hợp IL1-FokI sao cho mỗi vị trí gắn kết có kích cỡ khoảng 200 cặp bazơ để đảm bảo

rằng các trình tự nhận biết này là tiếp cận được đến protein dung hợp ngón tay kẽm-FokI trong môi trường chất nhiễm sắc phức hợp. Trong cấu trúc thứ hai, vị trí gắn kết I-SceI được hợp nhất vào cấu trúc đích (Fig. 6). Trong mỗi cấu trúc đích, các vị trí gắn kết được dung hợp với trình tự mã hoá *uidA* ở đầu tận N. Các mảnh gen *gfp* 5' và 3' nằm chồng lên nhau 540 cặp bazơ. Các trình tự chồng lên nhau này tạo ra tính tương đồng trong các trình tự đích và codon kết thúc được cài xen vào đầu 3' của mảnh *gfp* 5' để đảm bảo rằng không có sự phiên mã *gfp* chức năng từ trình tự đích.

Các trình tự đích được hợp nhất ổn định vào nuôi cấy huyền phù tế bào thuốc lá BY2 bằng cách dùng biến nạp bằng *Agrobacterium*. Nuôi cấy BY2 (thu được từ Jun Ueki of Japan Tobacco, Iwata, Shizuoka, Japan) được duy trì trong môi trường chứa muối cơ sở LS (PhytoTechnology Labs, Shawnee Mission, KS, #L689), 170 mg/L KH_2PO_4 , 30 g/L sucroza, 0,2 mg/L 2,4-D và 0,6 mg/L thiamin-HCL ở độ pH 6,0. Các tế bào BY2 được cấy chuyển cứ cách 7 ngày bằng cách thêm 0,25 ml PCV vào 50 ml môi trường trên cơ sở LS được chứa trong bình thót cổ dung tích 250ml trên máy lắc quay ở nhiệt độ 25°C và 125 vòng/phút. Để tạo ra nuôi cấy tế bào BY2 chuyển gen với trình tự đích được hợp nhất, bình thót cổ với huyền phù sau cấy chuyển bốn ngày hỗn dịch được chia thành 10-12 phần phân ước bốn ml mà được đồng nuôi cấy trong các đĩa petri 100x25 mm với 100 µl chủng *Agrobacterium* LBA4404 đã gắn pZFN-TARGET pDAB1585 (Fig. 4) hoặc pI-SceI-TARGET pDAB100375 (Fig. 7) cho phát triển qua đêm đến $\text{OD}_{600} \sim 1,5$. Các đĩa này được bọc bằng màng Nescofilm® (Azwel Inc. , Osaka, Japan) và ủ ở nhiệt độ 25°C không lắc trong thời gian 3 ngày sau đó phần chất lỏng dư được loại bỏ và được thay bằng 11 ml môi trường LS chứa 500 mg/lít carbenicillin. Sau khi tạo lại thành huyền phù các tế bào cây thuốc lá, phân tán 1 ml hỗn dịch lên các đĩa 100x25 mm chứa môi trường LS chứa 500mg/L carbenicillin và 200 mg/L hygromycin đã được hóa rắn bằng 8 g/L thạch TC (PhytoTechnology, Shawnee Mission, KS). Các đĩa ủ này được ủ không bọc ở nhiệt độ 28°C ở chỗ tối. Điều này tạo ra 120-144 đĩa chọn lọc cho một lần xử lý. Các dạng phân lập kháng hygromycin xuất hiện vào 10-14 ngày sau khi đưa vào đĩa và được đưa vào các đĩa riêng biệt 60x20 mm (một thể phân lập cho mỗi đĩa) trong đó các dạng

này được duy trì trong điều kiện chọn lọc như thể chai trong lịch trình cấy chuyển 14 ngày cho đến khi cần dùng cho thử nghiệm phân tích và tái biến nạp tiếp theo.

Các nuôi cấy tế bào chuyển gen kháng hygromycin chứa một bản sao có chiều dài đầy đủ hợp nhất trình tự đích được lựa chọn và được dùng để bắt đầu lại nuôi cấy huyền phù bằng cách cho vào khoảng 250-500 mg mô thể chai vào 40-50 ml môi trường LS cơ sở chứa 100 mg/L hygromycin và cứ 7 ngày lại cấy chuyển, như đã nêu trên.

Cả cụm tế bào và đơn tế bào (tạo ra như mô tả trong đơn patent đơn tế bào DAS, WO/2008/083233) được sử dụng trong các thử nghiệm này. Từ ba đến bốn ngày trước khi thử nghiệm, nuôi cấy huyền phù một tuần tuổi được cấy chuyển vào môi trường mới bằng cách chuyển 2 ml kết tụ huyền phù BY2 vào 40 ml môi trường LSBY2 chứa dịch đặc gốc este etyl của axit 4-clo-1,5-điphenyl-1H-pyrazol-3-yloxy)-axetic (như mô tả trong patent WO/2008/083233) 1-3% glyxerol, và 0,05-0,1% (thể tích/thể tích) DMSO trong bình thót cỡ 250ml. Các đơn tế bào được gom hoặc ở thời điểm 3,5 ngày hoặc 7 ngày sau khi xử lý để tạo ra đơn tế bào. Các đơn tế bào BY2 này được xử lý bằng hệ thống phân tích tế bào dòng chảy để xác định khả năng sống của tế bào và cũng như đánh giá độ ổn định tế bào thông qua sự soi kính hiển vi đồng tiêu điểm. Độ ổn định được phát hiện bằng cách theo dõi mức huỳnh quang nền, nếu có. Một phần trăm nhỏ tế bào thể hiện huỳnh quang nền phù hợp với tế bào chết, điều này chứng tỏ rằng huỳnh quang nền là từ tế bào đang bị hoại tử. Cả đơn tế bào và khối kết tụ huyền phù bình thường được dùng trong các thử nghiệm sau khi thí nghiệm huỳnh quang nền.

Ví dụ 3- Phủ hạt nano (NP) bằng SSN để chuyển vận vào tế bào thực vật.

Keo vàng có kích cỡ đường kính 150 nm (BBI International, GC150), 5-((2-(và-3)-S (axetylmercapto)succinoyl)amino) fluorescein (fluorescein SAMSA: Invitrogen, A-685), hạt nano của keo vàng đa chức axit carboxylic kích cỡ 80 và 90 nm (TedPella, 32019), Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuxinimit), EDC(1-etyl-3-[3-đimetylaminopropyl]carbodiimide hydroclorua), (Pierce Biototechnology, 24510, 22980.), MES (axit 2-[N-morpholino]etan sulfonic) (Fisher Scientific,

AC32776-1000), gói dung dịch đệm nước muối đệm phosphat (Sigma, P5368-10PAK), GFP được gắn đuôi histidin (Evrogen, cực đại kích thích - 482 nm, cực đại phát xạ - 502 nm, FP611), YFP turbo (Evrogen, cực đại kích thích - 525 nm, Cực đại phát xạ - 538 nm, FP611), Propiđi iodua (Sigma- P4864), Fluorescein điacetat (Sigma, F7378) là các dạng NP đa chức được phủ bằng SSN và được dùng để chuyển vận vào dịch nuôi cấy tế bào đích.

(i) Điều chế thể liên hợp hạt nano

(a) Tổng hợp thể liên hợp vàng-fluorescein không có SSN dùng cho xử lý đối chứng: thể liên hợp vàng-fluorescein được điều chế theo phương pháp được mô tả trước đây (Cannone et. al. 2006) để chuyển vận và theo dấu các hạt trong đám BY2 hoặc đơn tế bào không có SSN. Một (1) mg SAMSA fluorescein được hoà tan trong 100 μ l 0,1 M NaOH và được khuấy xoáy trong thời gian 15 phút để tách loại nhóm axetyl bảo vệ thiol. Sau đó, SAMSA hoạt hoá này được trộn với 100 μ l hạt keo vàng 150 nm (~109 hạt/ml). Sau đó, dung dịch này được ủ trong thời gian 1 giờ để đảm bảo hoàn thành phản ứng. Tiếp theo, cho 50 μ l 1M HCl vào để trung hoà dung dịch này. Dung dịch này được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian 30 phút và dịch nổi trên bề mặt được loại bỏ. Viên nhỏ màu vàng thu được được tái tạo huyền phù trong 200 μ l 0,1 M PBS, tạo ra dung dịch màu da cam. Bước tinh chế này được lặp lại hai lần để đảm bảo rằng loại bỏ SAMSA fluorescein tự do. Phương thức gắn SAMSA với vàng chủ yếu thông qua liên kết với lưu huỳnh. Do lực đẩy tĩnh điện đáng kể (SAMSA là dianion ở độ pH > 7), SAMSA được cho là nằm vuông góc với bề mặt keo vàng (Cannone et. al. 2006). NP như vậy được sử dụng theo dõi sự đi vào của số hạt fluorescein như vậy đi vào các tế bào như là đo lường của biểu thị của sự tuân thủ tế bào trong mỗi điều kiện nêu ra.

(b) Tổng hợp hạt nano vàng (GNP) được phủ SSN: Thể liên hợp GNP-SSN được tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả bởi Grabarek và Gergely, 1990 được cải biến đôi chút. 0,25 ml dung dịch dạng keo vàng đa chức axit carboxyl 20- 150 nm (~109 hạt/ml) được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian 10 phút.

Sau khi bỏ dịch nổi trên bề mặt đi, dạng viên màu đỏ được tạo huyền phù trong 1 ml dung dịch đệm hoạt hoá (0,1 M MES, 0,5 M NaCl, pH 6,0). Sau đó, cho 0,4 mg EDC và 1,1 mgsulfo-NHS vào dung dịch này và khuấy xoáy trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, cho 9 µl ZFN-IL1FokI vào và ủ dung dịch thu được trong thời gian lên đến 2 giờ ở chỗ tối ở nhiệt độ trong phòng để protein và vàng phản ứng hoàn toàn. Tỷ lệ giữa hạt keo vàng và protein được sử dụng trong phản ứng này được xác định bằng cách tìm số lượng axit carboxylic có mặt trên hạt keo vàng. Trước hết, số lượng nhóm carboxylic có mặt trên một hạt keo vàng được tính toán bằng cách chia diện tích bề mặt của một hạt vàng (giả sử có hình cầu) cho bề mặt được chiếm của một nhóm carboxylic ($0,20 \text{ nm}^2$ (Kimura, et. al. 2002)). Sau đó, kết quả này được nhân với tổng số hạt keo vàng có mặt để thu được tổng số nhóm carboxylic có mặt trong toàn bộ dung dịch keo vàng. Số này là bằng với số nhóm amino có mặt trên lượng protein nêu ra. Hạt keo vàng dính với protein thông qua sự tạo thành của liên kết amit giữa axit carboxylic có mặt trên hạt keo vàng và nhóm amino có mặt trên protein (Grabarek and Gergely, 1990). Có khoảng 127285 phân tử protein dính vào một hạt nano vàng.

(ii) Xử lý tế bào:

a)Tiến trình hấp thu vàng và khả năng sống của tế bào theo thời gian: Các mẫu sau được chuẩn bị trong các đĩa 24 lỗ vô trùng : (i) 500 µl đám huyền phù đích hoặc đơn tế bào (đối chứng); (ii) 500 µl đám huyền phù BY2 hoặc đơn tế bào + 20 µl GNP+ 25 µl Fluorescein di-axetat (FDA) + 25 µl propidil iodua; và (iii) Các xử lý khác bao gồm 40, 60, 80 µl GNP đơn lẻ và kết hợp với ZFN-IL1FokI với các tế bào và nhuộm màu khả năng sống tế bào. Các mẫu xử lý được kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang vào 5, 20, 120 phút và cuối cùng sau 24-48 giờ để khẳng định khả năng sống của các tế bào này.

b)Xử lý Vàng-SAMSA fluorescein:Điều chế các mẫu sau trong các đĩa vô trùng 24 lỗ trước khi thử nghiệm: (i) 500 µl đám huyền phù đích hoặc đơn tế bào (đối chứng); (ii) 500 µl đám huyền phù đích hoặc đơn tế bào + 20 µl SAMSAfluorescein (đối chứng); và (iii) đám huyền phù đích hoặc đơn tế bào + 20 µl GNP-SAMSA-fluorescein được xử

lý và huyền phù được ủ trong thời gian 20 phút trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng để khẳng định sự tham gia của các hạt.

c) Xử lý ZFN-IL1FokI được phủ (ví dụ được gắn đuôi) GNP- Chuẩn bị các mẫu sau trong các đĩa vô trùng 24 lỗ trước khi xử lý tế bào hoặc đám huyền phù: (i) 500 μ l đám huyền phù đích hoặc đơn tế bào (đối chứng); (ii) 500 μ l đám huyền phù đích hoặc đơn tế bào + 9-20 μ l ZFN (đối chứng); và (iii) 500 μ l đơn tế bào + 10-40 μ l ZFN-IL1FokI được phủ (ví dụ được gắn đuôi) GNP. Các tế bào và các đám xử lý được ủ trong thời gian lên đến 2 giờ trong bóng tối ở nhiệt độ trong phòng trước khi thử nghiệm.

Xử lý đối chứng bằng cách sử dụng GNP được cột GFP/YFP được đưa vào trong tất cả các thử nghiệm để đảm bảo sự thâm nhập không xâm nhập và định thời gian đi vào tối ưu được sử dụng như là hướng dẫn trong các thử nghiệm này (See Fig 5). Ngoài ra, peptit thâm nhập tế bào dung hợp (CPP - cell penetrating peptides) được dung hợp (ví dụ tạo đa chức) với NP để theo dõi đầu vào thời gian thực của các hạt vào đám huyền phù đích và đơn tế bào.

Ví dụ 4: Tổng hợp thể liên hợp SSN được gắn đuôi chấm lượng tử (QD).

QD tinh thể nano bán dẫn phát quang tạo ra ví dụ nguyên mẫu có tác động mạnh với nhiều ứng dụng sinh học đã được chứng tỏ (Thermes V, et al. 2002; Windbichler et al, 2007; Fajardo-Sanchez et. al, 2008; Arnould S, et al. , 2006). Tính hữu ích của chúng thu được từ kết hợp của các đặc tính quang lý điện duy nhất và kích cỡ tương đương với kích cỡ của protein lớn. Bán kính thủy động lực học của QD CdSe-ZnS ưa nước thay đổi từ ~5 nm (đối với mũ tinh thể nano được tạo đối với phối tử phân tử) đến ~20 nm (đối với các tinh thể nano được bao trong copolyme khối) (Smith J, et al. , 2006). Một QD đơn được liên hợp với một số phân tử sinh học (như kháng thể, peptit, ADN) để tạo ra thể liên hợp QD được phủ với cường độ liên kết chung tăng lên.

Việc sử dụng ZFN-IL1FokI được liên hợp (ví dụ được phủ) với QD ưa nước như là chiến lược thay thế để tạo thuận lợi cho sự hấp thu trong tế bào của chúng và chuyển

vận đến vị trí ADN thích hợp được mô tả trong ví dụ này. Phương pháp này thường tuân theo quy trình để nhập nội thành phần QD-protein đến các tế bào sống như mô tả đơn patent 65502.

(i) Tổng hợp QD: Các QD CdSe-lõi ZnS-vỏ với cực đại phát xạ tập trung ở 510 và 540 nm được tổng hợp bằng cách sử dụng các phản ứng từng bước của các tiền chất hữu cơ kim loại trong hỗn hợp dung môi phối trí nóng theo quy trình được mô tả (Lu et al. , 2007; Doyon et. al. 2006; Collins et. al. , 2003; Lanio et. al, 2000). Các tinh thể nano là đa chức và được làm ưa nước bằng cách trao đổi vỏ mũ nguyên thể chủ yếu bao gồm trioctyl phosphin và trioctyl phosphin oxit (TOP/TOPO), với các phối tử lưỡng chức như được mô tả trên đây (Lie et al. , 2002; Mani et. al. , 2005; Desjarlais and Berg, 1993). Hai tập hợp QD ưa nước được sử dụng: (1) tinh thể nano được chụp đầu mút chỉ bằng axitđihydroilipoic; và (2) tinh thể nano được chụp đầu mút bằng hỗn hợp gồm poly(etylen glycol)- axit dihydroilipoic treo vào (phân tử lượng PEG khoảng 600, DHLA-PEG) và biotin-đầu tận DHLA-poly(etylen glycol) (phân tử lượngPEG khoảng 400, DHLA-PEG-biotin) với tỷ lệ mol của các phối tử là 9:1. Các tập hợp này được gọi lần lượt là DHLA-QD và DHLA-PEG-biotin-QD.

(ii)Hiện lượng tự lắp ráp của thể liên hợp sinh học chấm lượng tử: Để tự lắp ráp thể liên hợp QD-ZFN-IL1FokI ở hóa trị mong muốn, cho His-ZFN ở tỷ lệ mol thích hợp vào 0,3 μ M DHLA-QD nằm ở đầu mút phát xạ 510nm trong dung dịch đệm 10 mM Tris-Cl pH 8 và ủ ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian 30 phút. Tương tự, cho b-PE-Streptavidin vào 0,3 μ M QD phát xạ 510nm (chụp đầu mút bằng DHLA-PEG:DHLA-PEG-biotin với tỷ lệ 9:1) trong nước muối đệm phosphat (137 mM NaCl, 10 mM phosphat, 2,7 mM KCl, pH 7,4, PBS) và ủ ở nhiệt độ 4 °C qua đêm; sự tạo thành thể liên hợp trong trường hợp này được hướng bởi các tương tác Streptavidin-biotin. Thể liên hợp được đặc tả bằng cách sử dụng điện di trên gel, trong đó các thay đổi tính linh động điện di của QD được lắp ráp với His-ZFN được treo vào hoặc Streptavidin-b được đánh dấu -PE được theo dõi. Các mẫu được pha loãng trong dung dịch đệm 1 x TBE (0,09 M Tris, 0,002 M Na₂-EDTA 0,09 M axit boric pH 8,3) và cho

chạy trên gel agarosa 1% hoặc 2% đối với lần lượt thể liên hợp QD-b-PE và YFP. Đặc biệt là, ảnh hưởng của sự thay đổi số phân tử ZFN-IL1Fok1 cho thể liên hợp sinh học QD được theo dõi nếu các phân tử này được dung hợp với protein phát huỳnh quang để theo dõi. Các ảnh trên gel được thu bằng cách kích thích QD và/hoặc protein và thu lấy ảnh huỳnh quang của các dải riêng biệt trong gel này. Sự tạo thành thể liên hợp được khẳng định bằng cách theo dõi các thay đổi về sự chuyển năng lượng giữa QD và protein huỳnh quang khi có hiện tượng tự lắp ráp. Thu lấy phổ huỳnh quang trên đĩa vi chuẩn đa chức Tecan Safire Dual Monochromator Multifunction Microtiter Plate Reader (Tecan, Research Triangle Park, NC) bằng cách sử dụng kích thích 325 nm. Để chuyển vận trong tế bào và làm hiện hình ảnh thử nghiệm, các QD được tự lắp ráp với hỗn hợp gồm ZFN-IL1Fok1 ở tỷ lệ mol ZFN:QD danh định.

(iii) Hấp thu trong tế bào của thể liên hợp chấm lượng tử - protein phát huỳnh quang: Các thử nghiệm nhập nội tế bào được thực hiện trong điều kiện vô trùng, như được mô tả trên đây. Thể liên hợp sinh học QD được pha loãng vào môi trường nuôi cấy đầy đủ, được cho vào dịch nuôi cấy tế bào, và ủ ở nhiệt độ 37 °C trong thời gian 1 hr ở nồng độ 40-150 $\mu\text{g/ml}$. Thể liên hợp được phủ QD bề mặt hỗn hợp bao gồm hoặc QD/ZFN và QD/b-PE theo tỷ lệ 1:5 hoặc 1:10 với hóa trị lắp ráp 1:1 đến 1:2,5, cùng với CPP ở lượng 50 CPP cho một QD, được ủ với dịch nuôi cấy tế bào ở các nồng độ thể liên hợp QD khác nhau. Thể liên hợp QD không liên kết dư được loại bỏ bằng cách rửa môi trường nuôi cấy ít nhất ba lần bằng PBS hoặc môi trường nuôi cấy tế bào. Sau đó các tế bào được gắn trong 3,7% paraformaldehyt trong thời gian 10 phút ở nhiệt độ trong phòng, rửa hai lần bằng PBS, và được gắn trong môi trường gắn ProLong Antifade chứa thuốc nhuộm DAPI (Invitrogen) để nhuộm màu hạt nhân. Việc thu gom hiện hình ảnh huỳnh quang được thực hiện bằng cách sử dụng kính hiển vi Leica. Các hình ảnh huỳnh quang được chia gần nhau được gom và được định lượng bằng cách sử dụng hệ thống DualView được trang bị bộ lọc lưỡng sắc 565 nm. Đối với hiện hình ảnh tế bào 510 nm QD-YFP/ZFN, các mẫu được kích thích ở 488 nm và sự phát ra được gom/được tách riêng bằng lưỡng sắc 565 nm và được mở cuộn. Huỳnh quang QD được thu ở $\lambda < 565 \text{ nm}$

và đuôi huỳnh quang YFP được gom ở $\lambda > 565$ nm. Sự thất thoát YFP vào cửa sổ QD được trừ đi như là một phần của sự mở cuộn. Các QD và b-PE ở 540 nm được kích thích ở 488 nm và sự phát tương ứng của chúng được tách riêng bằng bộ lọc lưỡng sắc 565 nm và được mở cuộn. Huỳnh quang DAPI được kích thích bằng cách sử dụng đèn Xe và sự phát được thu bằng cách sử dụng ô DAPI (D350/50x cho sự kích thích, 400DCLP lưỡng sắc, D460/50m cho việc phát hiện). AF647-TF được kích thích bằng cách sử dụng đèn Xe lamp và huỳnh quang được phát hiện bằng cách sử dụng ô Cy5 (kích thích HQ620/60x, Q660LP lưỡng sắc, phát ra HQ700/75m). Cả các ô kích thích/ phát hiện được đưa ra dùng theo Công nghệ Chroma Technology. Các hình ảnh kính hiển vi tương phản giao thoa vi sai (DIC - Differential interference contrast) được gom bằng cách sử dụng nguồn sáng chói.

(iv) Xác nhận QD được phủ ZFN-IL1FokI: Các tương tác His xuất hiện trực tiếp với bề mặt vô cơ giàu Zn của tinh thể nano. Việc điều khiển ZFN-IL1FokI bằng đầu tận N mang hai trình tự -(His)₆ được tách riêng bằng phân tử trung gian nhỏ và CPP có trình tự đầu tận N (His)₈ cho phép tạo thành phức hợp liên kết chặt QD—protein/peptit. Phương pháp gắn kết biotinavidin là phương pháp liên hợp sinh học phổ biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này do nó có tương tác mạnh ($KD \sim 10^{-15}$ M). Việc sử dụng bề mặt QD -được chụp đầu mút bằng hỗn hợp gồm PEG có đầu tận hydroxyl và biotin (DHLA-PEG-biotin-QD) cho phép liên hợp dễ dàng (ví dụ phủ) với b-PE-Streptavidin có sẵn trên thị trường.

(v) Sự chuyển vận thể liên hợp QD-ZFN-IL1FokI trong tế bào: Để khẳng định rằng sự hấp thu của QD đa chức (ví dụ được chức hoá bề mặt) được phủ bằng mặt hàng YFP/ZFN-IL1FokI là qua trung gian sự có mặt của CPP trên bề mặt tinh thể nano, dòng tế bào BY2 đích được ủ riêng rẽ với ba dạng thể liên hợp: thể liên hợp QD-CPP (10-100 CPP cho QD), QD-ZFN-IL1FokI/CPP, và QD được lắp với hỗn hợp gồm ZFN-IL1FokI và CPP (QD-ZFN-IL1FokI-CPP với khoảng 10 ZFN-IL1FokI và khoảng 50 CPP cho mỗi thể liên hợp). Các tế bào này được ủ với các dung dịch thể liên hợp QD phát 510nm (ở nồng độ ~ 75 nM), được rửa để tách loại chất liệu không liên kết bất kỳ, và sau đó được

hiện hình ảnh bằng cách sử dụng kính hiển vi huỳnh quang. Các tế bào còn được nhuộm màu đối lập bằng DAPI để cho phép lần lượt hiện hình ảnh hạt nhân và hạt cơ quan nội bào. Khi có thêm CPP trên bề mặt QD surface (thể liên hợp QD-ZFN-IL1FokI-CPP bề mặt hỗn hợp), xảy ra sự hấp thu trong tế bào đáng kể của thể liên hợp như được thể hiện bởi cường độ huỳnh quang đáng kể được đo cho cả hai tập tế bào. Ngoài ra, các hình ảnh được gom cho cả hai nuôi cấy cho thấy là có sự trùng lặp gần như hoàn toàn giữa mẫu huỳnh quang của QD và ZFN-IL1FokI/YFP. Sự đánh giá kiểu nhuộm màu và kiểu đồng định vị cho thấy là có sự phân bố ở màng hạt nhân, và chủ yếu giới hạn trong ngăn hạt cơ quan nội bào. Sự nhập nội hiệu quả của thể liên hợp QD bởi các dòng tế bào trong sự có mặt của CPP cho thấy là CPP tạo thuận lợi cho sự hấp thu trong tế bào QD được đa chức hóa (ví dụ được chức hóa bề mặt) bằng mặt hàng ZFN-IL1FokI-protein dung hợp phát huỳnh quang.

Các đơn tế bào và các đám kết tụ được xử lý tương tự với xử lý NP như được mô tả trong phần hạt nano và được dần mỏng mà không có chọn lọc và được theo dõi về khuẩn lạc biểu hiện GFP 2-4 tuần sau khi thử nghiệm.

Ví dụ 5 - Sửa chữa dựa vào tính tương đồng sau khi chuyển vận SSN vào tế bào cây thuốc lá thông qua GNP và QD

Dòng tế bào đích với các vị trí gắn kết ZFN hoặc I-SceI hợp nhất được xử lý bằng ZFN-IL1FokI hoặc I-SceI được cột chặt vào các hạt này, như đã nêu trên, được dần mỏng trên môi trường của đĩa Petri. Các tế bào được dần mỏng trên môi trường không chọn lọc sau khi xử lý. Phát hiện thấy tiêu điểm huỳnh quang xanh lá cây sau 7 ngày. Để khẳng định rằng huỳnh quang quan sát được tạo ra từ sự khôi phục gen *gfp* chức năng, nguồn các đoạn mô phát huỳnh quang được phân lập và được làm giàu bằng cách thao tác thủ công thông qua một số lần cấy chuyển chọn lọc. ADN của hệ gen được phân lập từ các mô phát huỳnh quang này và được đánh giá bằng PCR bằng mẫu dò gắn trên mỗi mảnh gen *gfp*. Các mẫu được làm giàu từ các mô phát huỳnh quang được xử lý bằng SSN, khi được khuếch đại, tạo ra sản phẩm PCR được dự đoán 0,6 kb điều này chứng tỏ rằng sự tái

tổ hợp thấy trước này đã tái tổ chức gen *gfp* chức năng trong các mô này. Cũng nhận thấy sản phẩm PCR bổ sung 4,1 kb trong các mẫu được làm giàu, điều này chứng tỏ sự có mặt của trình tự gen thông báo không được tái tổ hợp trong quần thể tế bào. Đây không phải là kết quả không dự tính khi biết phương pháp này chọn lọc bằng mắt mô phát huỳnh quang được dùng để đạt được sự làm giàu tế bào dương tính *gfp*.

Trong khi một số khía cạnh và các phương án lấy làm ví dụ đã được bàn luận trên đây, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận biết được các cải biến khác, hoán vị, bổ sung và kết hợp phụ của chúng. Do đó, dự tính rằng yêu cầu bảo hộ kèm theo đây và yêu cầu bảo hộ được sửa đổi sau đó được xem là bao gồm tất cả các cải biến khác, hoán vị, bổ sung và kết hợp phụ như vậy như nằm trong nội dung và phạm vi đúng đắn của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp đưa nucleaza đặc hiệu trình tự (SSN - Sequence Specific Nuclease) vào tế bào thực vật, phương pháp này bao gồm các bước:

phủ hạt nano bằng SSN, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được bao bằng peptit thâm nhập tế bào;

cho tế bào có thành tế bào và hạt nano được phủ này tiếp xúc với nhau; và

cho hạt nano và SSN hấp thu vào tế bào thực vật có thành tế bào.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đầu tiên là chuẩn bị tế bào thực vật có thành tế bào.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó quá trình phủ hạt nano bằng SSN bao gồm việc cố định SSN trên bề mặt hạt nano bằng quá trình hấp thụ không cộng hoá trị.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước hấp thụ SSN vào hạt nano.

5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho hạt nano hấp thụ vào cấu phần của tế bào thực vật có thành tế bào.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phủ hạt nano bằng protein hướng đích cấu phần ở dưới mức tế bào.

7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó cấu phần này được chọn từ nhóm gồm dịch bào, nhân, màng không bào, lục thể, tiền lục thể, sắc thể, vô sắc thể, lục thể, lục thể, và khoang của màng kép.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tế bào thực vật có thành tế bào là từ thực vật được chọn từ nhóm gồm tế bào cây thuốc lá, cây cà rốt, cây ngô, cây cải dầu, cây nho, cây bông, cây lạc, cây đậu tương, *Oryza sp.*, *Arabidopsis sp.*, *Ricinus sp.*, và cây mía.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tế bào thực vật này có nguồn gốc từ mô được chọn từ nhóm gồm phôi, mô phân sinh, thể chai, hạt phấn, lá, bao phấn, rễ, đầu rễ, hoa, hạt, vỏ giáp và thân cây.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hạt nano được chọn từ nhóm gồm hạt nano vàng, hạt nano phủ vàng, hạt nano xoắn, hạt nano mao quản trung bình, hạt nano silic đioxit, hạt nano polyme, hạt nano vonfram, hạt nano gelatin, vỏ nano (nanoshell), lõi nano (nanocore), quả cầu nano (nanosphere), que nano (nanorod), hạt nano từ tính, hạt nano bán dẫn, chấm lượng tử, chất nền nano (nanomatrix), chất nền nano dạng nhánh (dendritic nanomatrix) và dạng kết hợp của chúng.
11. Phương pháp theo điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tạo dẫn xuất bề mặt hạt nano.
12. Phương pháp theo điểm 2, trong đó SSN này là enzym ZFN (zinc finger nuclease - nucleaza ngón tay kẽm) bao gồm protein ZFP (zinc finger protein - protein ngón tay kẽm) với miền nucleaza độc lập với trình tự, tốt hơn là thu được từ endonucleaza giới hạn kiểu IIS FokI.
13. Phương pháp theo điểm 12, trong đó còn bao gồm bước chọn lọc các tế bào đã hợp nhất ổn định ZFN.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó các tế bào được chọn lọc này là các tế bào có thể tăng sinh.
15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước tăng sinh thực vật từ các tế bào có thể tăng sinh.

16. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hạt nano này là hạt nano đa chức.
17. Chế phẩm chứa hạt nano được phủ SSN, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được bao bằng peptit thâm nhập tế bào.
18. Tế bào thực vật có thành tế bào và được chuyển nhiễm bằng hạt nano được phủ SSN, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh hoặc hạt nano được phủ bằng peptit thâm nhập tế bào.
19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó hạt nano là chất nền nano dạng nhánh polyamidoamin (PAMAM).
20. Chế phẩm theo điểm 17, trong đó hạt nano này là chất nền nano dạng nhánh polyamidoamin (PAMAM).

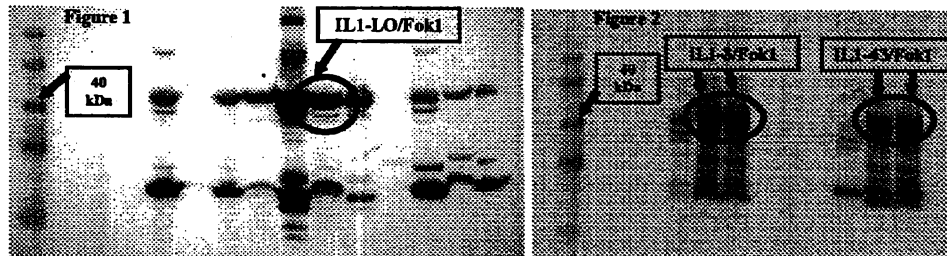
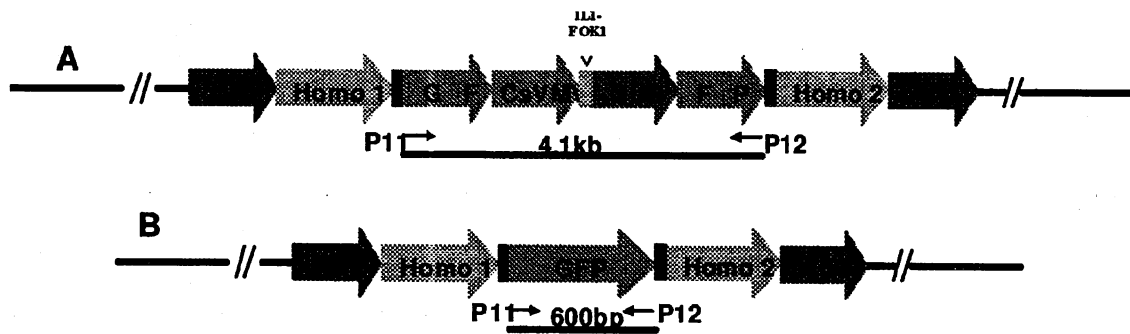


Fig 1 và Fig 2: Biểu hiện của ZFN-IL1Fok1 gắn nhãn histidin (1) và gắn nhãn phi histidin (2)



GFP tái cấu trúc

Fig 3: Tái tổ hợp tương đồng giữa các nhiễm sắc thể được kích thích bởi protein dung hợp ngón tay kẽm IL-1-Fok1. A Vật truyền gốc. B. Tái tổ hợp với gen GFP tái cấu trúc

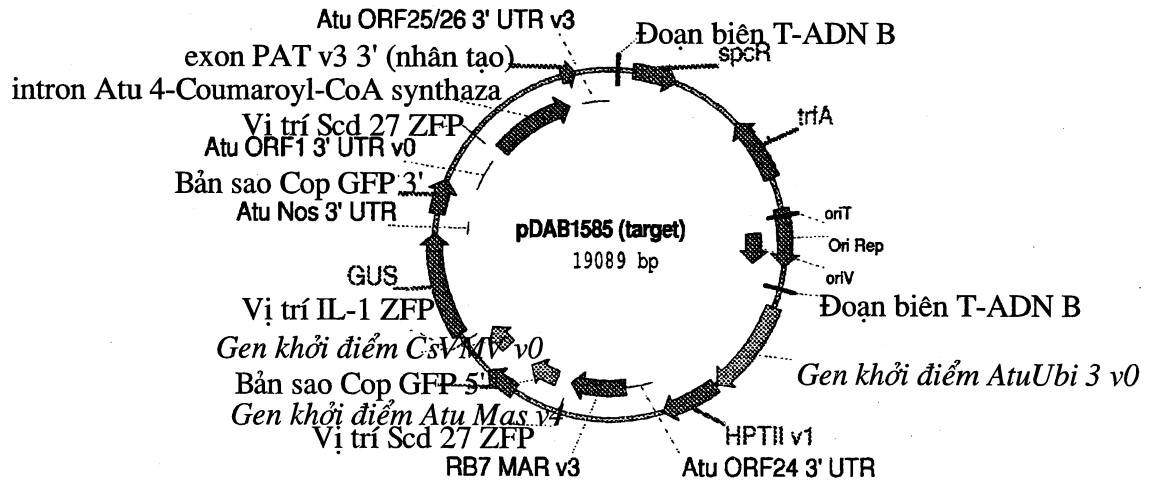


Fig 4: Thể hiện plasmid pDAB1585 bằng sơ đồ

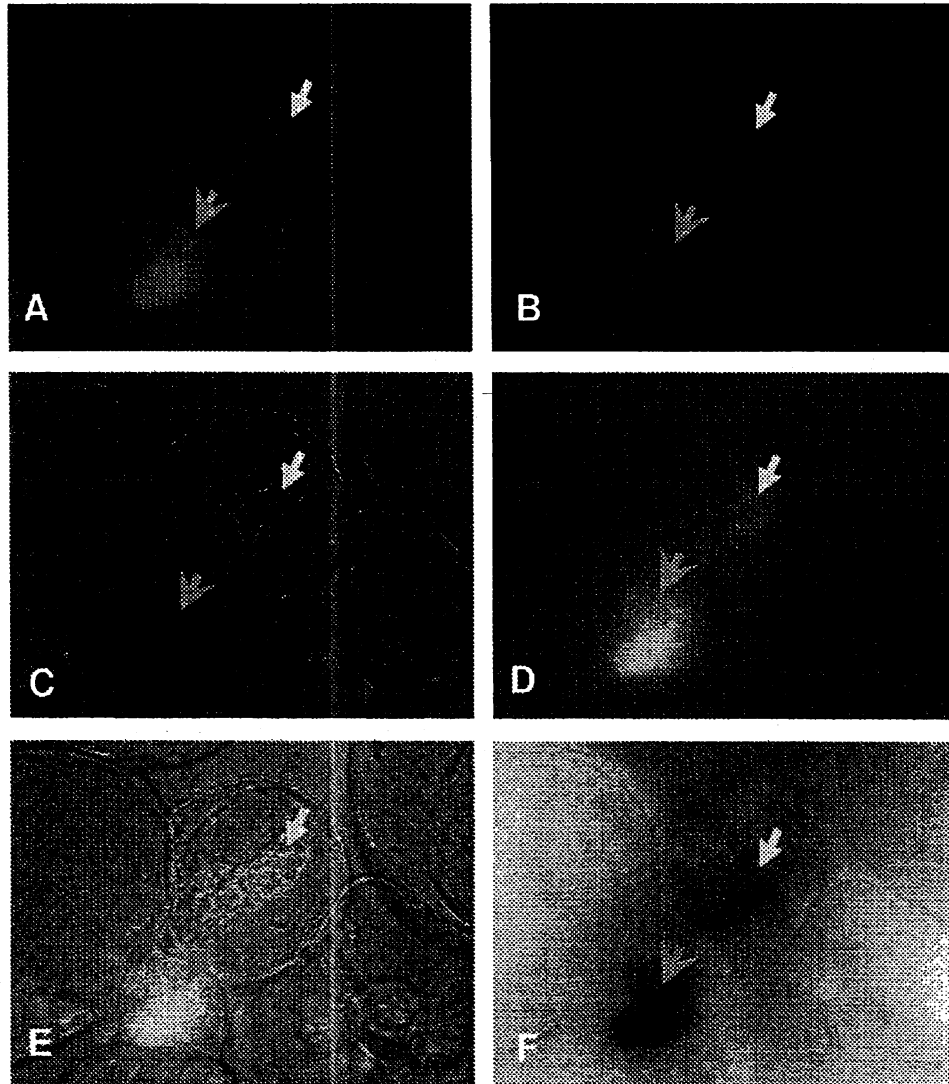


Fig 5: Các dòng đơn bào BY2-E thể hiện nội hóa YFP qua trung gian GNP 2 giờ sau khi ủ tế bào

Bảng A (FITC), B (Rhodamin), C (DIC), D (A+B), E (A+B+C), F (ảnh phản xạ ngược)

Nội hóa YFP được quan sát qua kính hiển vi huỳnh quang. Mũi tên màu vàng thể hiện

nội hóa trong đơn bào sống với YFP trong chất nguyên sinh (được phân tán và đặc lại ở trong nhân). Mũi tên màu da cam thể hiện nội hóa trong tế bào huyết tương hóa trong đó khối thể nguyên sinh ép nóng trong tế bào thể hiện huỳnh quang mạnh biểu thị nội hóa YFP trong tế bào. Tế bào này được tìm thấy trong cùng mặt phẳng tiêu cự của tế bào sống được nằm kề cận nhưng ở phía dưới các tế bào sống khác.

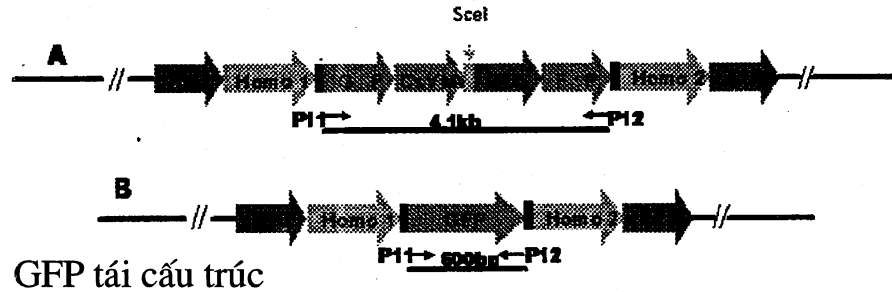


Fig 6: Tái tổ hợp tương đồng giữa các nhiễm sắc thể được kích thích bởi protein Meganucleaza I-SceI. A Vật truyền gốc. B. Tái tổ hợp với gen GFP tái cấu trúc

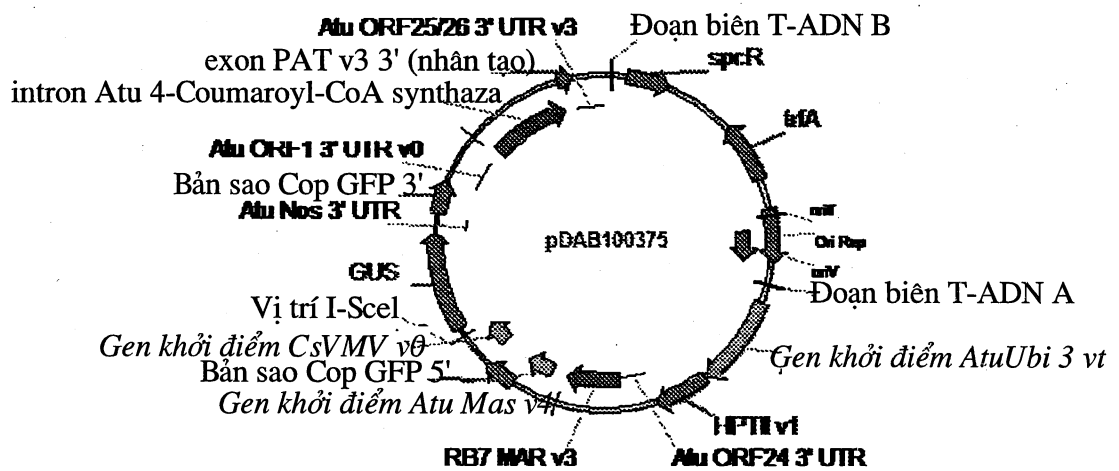


Fig 4: Thể hiện plasmid pDAB100375 bằng sơ đồ