



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
2-0002070

(51)⁷ **C12Q 1/68, C12N 15/29, A01H 1/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00238

(22) 12.07.2018

(45) 26.08.2019 377

(43) 25.09.2018 366

(73) **VIỆN NGHIÊN CỨU NGÔ (VN)**

Thị trấn Phùng, Đan Phượng, thành phố Hà Nội

(72) **Nguyễn Xuân Thắng (VN), Bùi Mạnh Cường (VN), Đoàn Thị Bích Thảo (VN)**

(54) **PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP CÓ NGUỒN GỐC TỪ SỰ KIẾN CHUYỂN GEN
C4-52-1 VÀ CÂY NGÔ CHUYỂN GEN CHỊU HẠN CHỨA PHÂN TỬ NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến sự kiện chuyển gen C4-52-1, cụ thể là đề cập đến phân tử ADN tái tổ hợp có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen C4-52-1 và cây ngô chuyển gen chịu hạn chứa phân tử này. Cây ngô theo giải pháp hữu ích có khả năng di truyền và biểu hiện ổn định sự kiện C4-52-1 qua các thế hệ để tăng cường tính chịu hạn cho cây. Ngoài ra, giải pháp hữu ích còn đề cập đến các đoạn môi đặc hiệu để nhận biết sự kiện C4-52-1 này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen C4-52-1 và cây ngô chuyển gen chịu hạn chứa phân tử này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ngô là cây trồng quan trọng ở nhiều vùng trên thế giới, đã có nhiều phương pháp cải tạo giống ngô nhằm tạo ra cây ngô có các tính trạng được cải thiện. Một tính trạng được cải thiện đó là khả năng chịu được hạn để đảm bảo cây ngô có thể thích nghi được với các điều kiện môi trường khắc nghiệt. Đã có nhiều nghiên cứu liên quan đến việc chuyển gen vào cây ngô để tăng tính chịu hạn, ví dụ, đơn đăng ký giải pháp hữu ích số 2-2015-391 của Viện Nghiên cứu Ngô đã mô tả gen *ModiCspB* từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* để tăng cường tính chịu hạn cho cây, trong đó gen này được thiết kế và chuyển vào cây ngô bởi vectơ tách dòng pCAMBIA1300 để chuyển vào cây ngô. Tài liệu này cũng đề cập đến quy trình chuyển gen vào cây ngô nhằm tăng tính chịu hạn.

Biểu hiện của gen chuyển chịu hạn trong cây là hữu ích để tạo ra cây có đặc tính mong muốn, nhưng chúng có thể bị ảnh hưởng bởi vị trí nhiễm sắc thể của gen chuyển, có thể bởi cấu trúc chất nhiễm sắc (ví dụ, chất dị nhiễm sắc), hoặc vị trí xung quanh các yếu tố điều hòa phiên mã (ví dụ, các chất tăng cường) gần với vị trí tích hợp. Vì lý do này, thường cần phải sàng lọc rất nhiều sự kiện biến nạp đối với từng cá thể để có thể thu được sự kiện có biểu hiện tối ưu của gen chuyển và do đó có tính đặc hiệu mong muốn. Ví dụ, đã quan sát thấy rằng đối với các sự kiện khác nhau, cây có thể có nhiều thay đổi trong mức biểu hiện gen. Ngoài ra, có thể cũng có những khác biệt trong mô hình không gian hoặc thời gian biểu hiện, ví dụ, có sự khác biệt trong các mức biểu hiện của gen chuyển liên quan trong các mô thực vật khác nhau, mà điều này có thể không tương ứng với các mô hình được mong đợi từ các yếu tố điều hòa phiên mã có mặt trong cấu trúc gen được đưa vào. Vì lý do này, có thể phải tạo ra hàng trăm đến hàng nghìn sự kiện chuyển gen khác nhau và sàng lọc các sự kiện này để thu được sự kiện có các mức biểu hiện gen chuyển mong muốn và các mô hình có thể sử dụng cho mục đích thương mại. Như vậy, sự kiện có các mức hoặc mô hình biểu hiện

gen chuyển mong muốn sau đó có thể được sử dụng để thâm nhập gen chuyển vào các nền di truyền thông qua lai hữu tính bằng các phương pháp nhân giống cây. Thế hệ con lai của các giống lai đó sẽ có các đặc tính biểu hiện gen chuyển của thể biến nạp gốc. Điều này có thể được sử dụng để đảm bảo biểu hiện gen đáng tin cậy trong nhiều giống khác nhau mà được làm cho thích nghi với các điều kiện sinh trưởng ở địa phương cụ thể.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Để giải quyết các vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp có nguồn gốc từ sự kiện C4-52-1 và cây ngô chuyển gen chứa sự kiện này thể hiện khả năng chịu được hạn có thể chấp nhận được về mặt thương mại, có hạt giống đại diện được nộp lưu tại Viện Nghiên cứu Ngô, thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Nội, Việt Nam với số nộp lưu NL-C4-52-1. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất hạt giống, thế hệ con lai, phần của cây, tế bào và các sản phẩm hàng hóa của cây ngô chứa sự kiện C4-52-1. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất phương pháp sản xuất sự kiện ngô chuyển gen C4-52-1 chịu được hạn.

Giải pháp hữu ích đề xuất các phân tử ADN liên quan đến sự kiện cây ngô C4-52-1. Các phân tử ADN này có thể bao gồm các trình tự nucleotit là kết quả của hoặc có nguồn gốc từ: sự tiếp hợp giữa đoạn chèn gen chuyển và ADN hệ gen kẹp sườn của sự kiện cây ngô C4-52-1, và/hoặc miền của ADN hệ gen kẹp sườn ADN được chèn, và/hoặc miền của ADN chuyển gen được tích hợp kẹp sườn vị trí chèn, và/hoặc miền của caxét biểu hiện gen chuyển được tích hợp, và/hoặc trình tự liên kề với miền bất kỳ trong số các miền này. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất các phân tử ADN hữu ích làm đoạn mồi và đầu dò để chẩn đoán sự kiện cây ngô C4-52-1. Cây ngô, tế bào cây, phần của cây, các sản phẩm hàng hóa, thế hệ con lai và hạt giống từ cây ngô bao chứa các phân tử này cũng được đề cập.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất phương pháp, chế phẩm và kit hữu ích để phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện cây ngô C4-52-1. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất phương pháp phát hiện sự kiện C4-52-1 bằng cách cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với tập hợp đoạn mồi mà khi được sử dụng trong phản ứng khuếch đại axit nucleic với ADN hệ gen từ sự kiện cây ngô C4-52-1, sẽ thu được ADN được khuếch đại để phát hiện sự kiện cây ngô C4-52-1, thực hiện phản ứng khuếch đại axit nucleic, bằng cách đó tạo ra ADN được khuếch đại và phát hiện ADN được khuếch đại này.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất phương pháp phát hiện sự kiện C4-52-1 bằng cách cho mẫu chứa ADN tiếp xúc với đầu dò mà khi sử dụng trong phản ứng lai với ADN hệ gen từ sự kiện C4-52-1 với phân tử ADN đặc hiệu cho sự kiện cây ngô C4-52-1, để thực hiện phản ứng lai và phát hiện sự lai của đầu dò này với phân tử ADN. Kit bao gồm phương pháp và chế phẩm theo giải pháp hữu ích để phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện cây ngô C4-52-1 cũng được đề xuất.

Giải pháp hữu ích đề xuất cây ngô, hạt giống, tế bào cây, cây thế hệ con lai, phần của cây, hoặc sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ cây, tế bào cây, hoặc hạt giống của cây ngô chứa sự kiện C4-52-1 có khả năng chịu hạn. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất cây ngô, hạt giống, tế bào cây, cây thế hệ con lai, phần của cây, hoặc sản phẩm hàng hóa chứa phân tử nucleotit có trình tự nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1, và các phần bổ sung và các đoạn của nó hoặc phân tử ADN có mức độ giống nhau về trình tự ít nhất là 90% so với trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Giải pháp hữu ích cũng đề xuất cây ngô, hạt giống, tế bào cây, cây thế hệ con lai, phần của cây, hoặc sản phẩm hàng hóa có nguồn gốc từ cây hoặc hạt giống của cây ngô chứa sự kiện C4-52-1 và phân tử ADN mà tạo ra phân tử ADN được khuếch đại có trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình. 1 là sơ đồ gen chuyển của sự kiện C4-52-1 trong đó tương ứng với vị trí liên quan của miền tiếp hợp của với hệ gen của cây ngô (được đề cập như SEQ ID NO. 1), trong đó gen *ModiCspB* kích thước 261bp được chèn giữa đoạn pro35S kích thước 456bp và đoạn 35S kích thước 256bp, đầu 3' đoạn LB được tiếp hợp với đầu 5' của hệ gen của cây ngô, tiếp đến là trình tự 35S kích thước 175bp và đoạn Hyg kích thước 678bp. Theo thứ tự, từ trái sang phải, sự kiện C4-52-1 bao gồm đoạn LB, 35S (175bp), Hyg (1026bp), pro 35S (678bp), 35S (256bp), *ModiCspB* (261 bp) và pro35S (456bp) được tiếp hợp với hệ gen cây ngô tạo ra cấu trúc bao gồm trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 với 145 bp và 563 bp của hệ gen cây ngô ở đầu tiếp hợp 3' và 5' tương ứng, trình tự này đại diện cho các trình tự tiếp hợp của sự kiện C4-52-1. Phần gạch chân chỉ các nucleotit của hệ gen cây ngô liên kề.

Hình 2 là kết quả PCR chứng minh kết hợp của gen *modiCspB* của sự kiện C4-52-1 vào hệ gen của cây ngô được di truyền ổn định qua ba thế hệ khảo nghiệm. Trong đó thể hiện đánh giá khảo nghiệm đối với 20 mẫu trong 3 thế hệ liên tiếp (từ T3 đến

T5) với 1 là thang chuẩn, 2 là đối chứng dương, 3 là đối chứng âm, là cây không chuyển gen (dòng nền), 5-20, gồm 15 mẫu đại diện cho sự kiện C4-52-1. (A) là kết quả thử nghiệm đánh giá cho thể hệ T3, (B) là kết quả thử nghiệm đánh giá cho thể hệ T4 và (C) là kết quả thử nghiệm đánh giá cho thể hệ T5.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Các định nghĩa và phương pháp được đề cập sau đây nhằm xác định giải pháp hữu ích rõ ràng và hướng dẫn cho người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này thực hiện được giải pháp hữu ích. Trừ khi có quy định khác, các thuật ngữ được hiểu theo cách sử dụng thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan.

Giải pháp hữu ích đề xuất phân tử ADN tái tổ hợp có nguồn gốc từ sự kiện C4-52-1 và cây ngô chuyển gen chứa sự kiện C4-52-1 mà biểu hiện chịu được hạn. Sự kiện này chứa đoạn ADN được chèn vào trong nhiễm sắc thể/hệ gen của gen nguyên sinh của cây ngô. Cây chứa sự kiện này có thể được tạo ra bằng cách: a) biến nạp tế bào cây có cấu trúc axit nucleic chứa gen chuyển quan tâm, b) tái sinh quần thể cây tạo ra từ việc chèn gen chuyển vào trong hệ gen của cây, và c) lựa chọn cây cụ thể được đặc trưng bởi đoạn chèn của gen chuyển vào trong vị trí đặc hiệu trong hệ gen của cây. Thuật ngữ "sự kiện" chỉ đoạn gen chuyển đặc hiệu được chèn vào vị trí đặc hiệu trong hệ gen. Cây chứa sự kiện này bao gồm cả thế hệ con lai của thể biến nạp chứa gen chuyển được chèn vào trong vị trí đặc hiệu trong hệ gen của cây. Thế hệ con lai đó mà có thể được tạo ra bằng cách lai hữu tính giữa các thể biến nạp, hoặc thế hệ con lai của nó với cây khác. Cây khác đó có thể là cây chuyển gen chứa cùng gen chuyển hoặc chứa gen chuyển khác nhau và/hoặc cây không chuyển gen như cây từ giống khác nhau. Thế hệ con lai có thể được tạo ra bằng cách ngược được lặp lại với cây bố mẹ, trong đó ADN được chèn và ADN kẹp sườn từ bố mẹ được biến đổi gen có mặt trong thế hệ con lai của cây lai ở cùng vị trí trong hệ gen.

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "cây ngô" nghĩa là *Zea mays L.* và bao gồm tất cả các giống cây mà có thể được nhân giống với cây ngô, bao gồm cây ngô hoang dại cũng như các cây thuộc giống *Zea mays L.* mà cho phép nhân giống giữa các loài.

Thuật ngữ "sự kiện" chỉ phân tử ADN từ thể biến nạp gốc chứa ADN được chèn và ADN hệ gen cây ngô kẹp sườn gần kề ngay với ADN được chèn. Phân tử ADN này

được tạo ra bằng tác động chèn ADN chuyển gen vào trong hệ gen của cây ngô, nghĩa là, bằng cách biến nạp. Do đó, phân tử ADN này chứa trình tự nucleotit mà cả hai đều đặc hiệu cho sự kiện và sự kiện đó chỉ liên quan đến hệ gen của cây ngô tạo ra hệ gen mà ADN chuyển gen được chèn, trong đó trình tự nucleotit này chứa cả trình tự của miền đặc hiệu của ADN hệ gen của cây ngô và của đoạn chèn ADN chuyển gen. Do đó, sự sắp xếp của ADN được chèn trong sự kiện C4-52-1 liên quan đến ADN hệ gen ngô bao quanh là đặc hiệu và chỉ liên quan đến sự kiện C4-52-1. Phân tử ADN này cũng là phần tích hợp của nhiễm sắc thể của cây ngô chứa sự kiện C4-52-1 và như vậy là ổn định trong cây và có thể được di truyền đến thế hệ con lai của cây.

Sự kiện C4-52-1 tạo cho khả năng chịu được hạn khi sử dụng cho cây ngô. “Hạn” chỉ sự thiếu hụt nước do môi trường gây nên trong suốt quá trình hoặc từng giai đoạn mà ảnh hưởng đến sự phát triển của cây. Mức độ tổn thương của cây trồng do khô hạn gây ra có nhiều mức khác nhau như chết, chậm phát triển hoặc vẫn có thể phát triển tương đối bình thường. Những cây trồng có khả năng duy trì sự phát triển và cho năng suất ổn định trong điều kiện khô hạn được gọi là cây chịu hạn. Khả năng của thực vật có thể giảm thiểu mức độ tổn thương do thiếu hụt nước gây nên gọi là tính chịu hạn

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "tái tổ hợp" chỉ dạng ADN và/hoặc protein và/hoặc sinh vật mà thường không tìm thấy được trong tự nhiên và chẳng hạn được tạo ra bởi sự can thiệp của con người. Sự can thiệp của con người có thể tạo ra phân tử ADN tái tổ hợp và/hoặc cây tái tổ hợp. Theo giải pháp hữu ích, “phân tử ADN tái tổ hợp” là phân tử ADN chứa các phân tử ADN kết hợp mà thường không xuất hiện trong tự nhiên mà là kết quả của sự can thiệp của con người, ví dụ, phân tử ADN chứa ít nhất hai phân tử ADN khác loại kết hợp với nhau, và/hoặc phân tử ADN được tổng hợp nhân tạo và chứa trình tự polynucleotit có nguồn gốc từ trình tự polynucleotit thường xuất hiện trong tự nhiên, và/hoặc phân tử ADN chứa gen chuyển được sát nhập một cách nhân tạo vào ADN hệ gen của tế bào chủ và ADN kẹp sườn được kết hợp của hệ gen của tế bào chủ. Ví dụ về phân tử ADN tái tổ hợp là phân tử ADN theo giải pháp hữu ích được tạo ra bằng cách chèn gen chuyển vào trong hệ gen của cây ngô, để cuối cùng tạo ra biểu hiện ARN và/hoặc phân tử protein tái tổ hợp trong sinh vật đó. Theo giải pháp hữu ích, "cây tái tổ hợp" là cây mà không xuất hiện trong tự nhiên, mà là kết quả của sự can thiệp của con người và chứa gen chuyển và/hoặc phân tử ADN

khác loại được sát nhập vào trong hệ gen của cây. Kết quả của sự biến đổi bởi con người là cây tái tổ hợp khác biệt một cách rõ rệt với cây kiểu đại liên quan. Ví dụ về cây tái tổ hợp là cây ngô chứa sự kiện C4-52-1 theo giải pháp hữu ích.

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "gen chuyển" chỉ phân tử polynucleotit được hợp nhất nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ. Gen chuyển có thể khác loại với tế bào chủ. Thuật ngữ "cây chuyển gen" chỉ cây chứa gen chuyển đó.

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "khác loại" chỉ phân tử thứ nhất thường không kết hợp với phân tử thứ hai trong tự nhiên. Ví dụ, phân tử này có thể có nguồn gốc từ loài thứ nhất và được chèn vào trong hệ gen của loài thứ hai. Do đó phân tử này sẽ khác loại với vật chủ và được hợp nhất nhân tạo vào hệ gen của tế bào chủ.

Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "khảm" chỉ phân tử ADN đơn được tạo ra bằng cách dung hợp phân tử ADN thứ nhất với phân tử ADN thứ hai, trong đó thường phân tử ADN thứ nhất hoặc phân tử ADN này không xuất hiện trong cấu trúc đó, nghĩa là, được dung hợp với nhau. Do đó, phân tử ADN khảm là phân tử ADN mà thường không xuất hiện trong tự nhiên.

Giải pháp hữu ích đề xuất phân tử ADN và các trình tự nucleotit tương ứng của chúng. Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "ADN", "phân tử ADN", "phân tử polynucleotit" chỉ phân tử ADN sợi kép của hệ gen hoặc có nguồn gốc tổng hợp, nghĩa là, polyme của các bazơ deoxyribonucleotit hoặc của phân tử polynucleotit, đọc từ đầu 5' (ngược chiều) đến đầu 3' (xuôi chiều). Theo giải pháp hữu ích, thuật ngữ "trình tự ADN", "trình tự nucleotit" hoặc "trình tự polynucleotit" chỉ trình tự nucleotit của phân tử ADN. Danh pháp theo giải pháp hữu ích là danh pháp được quy định bởi các bảng 1 và 3, phụ lục 2 của tiêu chuẩn WIPO ST.25 (1998). Giải pháp hữu ích được bộc lộ với sự tham chiếu tới một trong hai trình tự nucleotit có trong hệ gen của sự kiện chuyển gen C4-52-1 tại vị trí của ADN chuyển gen được chèn, đặc biệt có tham chiếu tới trình tự nêu trong SEQ ID NO. 1. Do đó, theo ý nghĩa và nguồn gốc, các trình tự bổ sung, cũng được đề cập trong lĩnh vực kỹ thuật này là trình tự bổ sung đầy đủ hoặc các trình tự bổ sung ngược, đều thuộc phạm vi của giải pháp hữu ích và do đó cũng được dự kiến thuộc phạm vi của đối tượng được yêu cầu bảo hộ.

Giải pháp hữu ích cũng đề xuất các phân tử ADN mẫu mà có thể được sử dụng như các đoạn mồi hoặc các đầu dò để chẩn đoán sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ

sự kiện C4-52-1 trong mẫu. Các đoạn môi hoặc đầu dò đó đặc trưng cho trình tự axit nucleic đích và như vậy là hữu ích cho việc nhận dạng sự kiện cây ngô C4-52-1 bằng các phương pháp được mô tả theo giải pháp hữu ích.

Do đó, các phân tử ADN và các trình tự nucleotit tương ứng theo giải pháp hữu ích là hữu ích để nhận biết sự kiện cây ngô C4-52-1, chọn các giống cây hoặc các cây lai chứa sự kiện C4-52-1, phát hiện sự có mặt của ADN có nguồn gốc từ sự kiện cây ngô C4-52-1 trong mẫu, và kiểm tra sự có mặt và/hoặc không có sự kiện cây ngô C4-52-1 hoặc cây và phần của cây chứa sự kiện cây ngô C4-52-1 trong mẫu.

Giải pháp hữu ích đề cập đến cây ngô, thế hệ con lai, hạt giống, tế bào cây, phần của cây chẳng hạn như phần hoa, nõn, quả, hoa, rễ hoặc mô của thân và lá có nguồn gốc từ cây ngô chuyển gen chứa sự kiện C4-52-1. Mẫu đại diện của hạt giống chứa sự kiện C4-52-1 đã được nộp nộp lưu tại Viện Nghiên cứu Ngô, thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Nội, Việt Nam với số nộp lưu NL-C4-52-1.

Cây theo giải pháp hữu ích có thể xác định theo sự kiện ADN, bao gồm từ gen chuyển, đến thế hệ con lai. Theo giải pháp hữu ích, "thế hệ con lai" bao gồm cây, hạt giống, tế bào cây, và/hoặc phần của cây bất kỳ có thể tái sinh chứa sự kiện ADN có nguồn gốc từ cây và/hoặc polynucleotit ban đầu có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1. Cây, thế hệ con lai, và hạt giống có thể là đồng hợp tử hoặc dị hợp tử với gen chuyển. Thế hệ con lai có thể được sinh trưởng từ hạt giống được tạo ra bởi cây chứa sự kiện C4-52-1.

Giải pháp hữu ích đề xuất phần của cây mà có nguồn gốc từ cây ngô chứa sự kiện C4-52-1 có khả năng chịu hạn. Theo giải pháp hữu ích, "phần của cây" chỉ phần bất kỳ của cây chứa vật liệu có nguồn gốc từ cây ngô chứa sự kiện C4-52-1. Phần của cây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phần hoa, hoa, rễ hoặc mô của thân và lá. Các phần của cây có thể phát triển và tồn tại độc lập, không phát triển và tồn tại độc lập, có thể tái sinh và/hoặc không thể tái sinh.

Cây, thế hệ con lai, hạt giống, tế bào cây, phần của cây theo giải pháp hữu ích có thể được đánh giá bởi thành phần ADN, biểu hiện gen, và/hoặc biểu hiện protein. Sự đánh giá này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn như PCR, thẩm tách Northern, thẩm tách Southern, thẩm tách Western, miễn dịch-kết tủa,

và ELISA hoặc bằng cách sử dụng các phương pháp phát hiện và/hoặc các kit phát hiện theo giải pháp hữu ích.

Phương pháp khác là kỹ thuật giải trình tự Pyro như được mô tả bởi Winge (Innov. Pharma. Tech. 00:18-24, 2000). Trong phương pháp này, oligonucleotit được thiết kế mà chồng lấn lên ADN hệ gen liền kề và tiếp hợp ADN chèn. Oligonucleotit được lai với sản phẩm khuếch đại nhiệt sợi đơn (bản sao sợi đơn) từ miền quan tâm (một đoạn môi trong số các trình tự được chèn với một đoạn môi trong trình tự hệ gen kẹp sườn) và được ủ trong điều kiện có polymeraza, ATP, sulfurylaza, luciferaza, apyaza, adenosin 5' phosphosulfat và luciferin. Các ddNTP được gắn vào từng phân tử một và việc gắn kết thành công tạo ra tín hiệu quang, tín hiệu quang này được đo. Tín hiệu quang này chỉ ra sự có mặt của đoạn chèn gen chuyển/trình tự kẹp sườn nhờ sự khuếch đại, lai, và kéo dài từng bazơ thành công.

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm chứng minh các ví dụ của các phương án được ưu tiên nhất định theo giải pháp hữu ích. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá cao rằng các kỹ thuật được bộc lộ trong các ví dụ mà sau khi trình bày các phương pháp tiếp cận này, có thể thực hiện được giải pháp hữu ích, và do đó có thể được xem là các ví dụ cấu thành các phương án ưu tiên để thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Biến nạp cây ngô và lựa chọn sự kiện

Ví dụ này mô tả cách tạo ra các sự kiện cây ngô chuyển gen và cách lựa chọn sự kiện C4-52-1. Sự kiện C4-52-1 chịu hạn được tạo ra bằng cách biến nạp trực tiếp gen *modiCspB* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bởi vector pCAMBIA 1300 theo quy trình được mô tả trong đơn đăng ký giải pháp hữu ích số 2-2015-391.

Trước tiên, các mô cây bên ngoài từ dòng ngô C436 được biến nạp với vector pCAMBIA 1300 chứa gen *modiCspB* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Tiếp đó, các tế bào biến nạp được chọn lọc và các tế bào sống sót được tái sinh thành cây. Quy trình biến nạp đã tạo ra các cây R0, với mỗi cây R0 là một sự kiện riêng biệt, độc lập. Các sự kiện R0 này được sàng lọc bằng PCR và phân tích Southern để loại bỏ các sự kiện tạo ra phức hợp nhiều phân tử và/hoặc bản sao. Để phân tích PCR, sử dụng phân tích TAQMAN® đầu cuối với ADN được chiết tách. Trên cơ sở sàng lọc PCR,

các sự kiện đánh số C1, C15, C4, C32, C13, C23 và C27 tương ứng và các lần chọn lọc được đánh số theo thứ tự. Các sự kiện R0 này sau đó đã được sàng lọc bằng phân tích Southern. Để phân tích Southern, ADN từ cây ngô, được phân cắt bằng BamHI, và được lai bằng cách sử dụng kỹ thuật phân tích lai thẩm tách Southern để xác định số bản sao của gen chuyển được chèn vào trong hệ gen cây ngô và chọn lọc sự kiện có các đoạn chèn đơn.

Sau đó, các sự kiện này được nuôi cấy tạo cây để phân tích kiểu hình và khả năng sinh sản để nhận biết các cây không cùng loại. Từ việc sàng lọc kiểu hình và khả năng sinh sản trong buồng sinh trưởng, các sự kiện tối ưu được lựa chọn để hoàn thiện. Các sự kiện được chọn sau đó được sàng lọc về đặc tính chịu hạn trong các buồng sinh trưởng. Các cây này cũng đã được phân tích bằng cách phân tích Southern bậc hai để giữ nguyên đoạn chèn gen chuyển. Sử dụng dữ liệu được thu thập từ các phép phân tích này, các sự kiện tối ưu được lựa chọn để hoàn thiện. Tiếp theo, các cây chứa các sự kiện tối ưu được đề xuất cho các thử nghiệm trên cánh đồng. Dữ liệu thử nghiệm trên cánh đồng cho đặc tính của các cây cho từng sự kiện trong số 7 sự kiện trong một mùa sinh trưởng và cho 4 sự kiện trong các mùa khác nhau. Trong năm thứ nhất thử nghiệm trên cánh đồng, 7 sự kiện đã được thử nghiệm cho khả năng chịu hạn và sự cân bằng nông học ở tối thiểu 3 vị trí trong thiết kế thử nghiệm trên cánh đồng lặp lại nhiều lần. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: Kết quả thử nghiệm trên cánh đồng mùa thứ nhất

Các thông số:	Sự kiện						
	C1	C15	C4	C32	C13	C23	C27
Hiệu quả							
Khả năng chịu hạn trong thời kỳ sinh dưỡng	Có	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Năng suất:	Có	Có	Có	Có	Không	Có	Có
Khả năng sinh sản, kiểu hình	Không	Có	Có	Có	Có	Có	Không
Nông học							
Năng suất:	Có	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Khả năng sinh sản, kiểu hình	Có	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Thử nghiệm trên cánh đồng có đạt không?	Không	Có	Có	Có	Không	Có	Không

Các dữ liệu này sau đó đã được sử dụng để lựa chọn các sự kiện dẫn đầu gồm C15-15, C4-52, C32-17 và C23-6 được đề xuất cho các thử nghiệm trên cánh đồng năm thứ hai. Trong các thử nghiệm trên cánh đồng năm thứ hai này, năm sự kiện dẫn đầu đã được thử nghiệm đối với khả năng chịu hạn và sự cân bằng nông học trong thiết kế thử nghiệm trên cánh đồng lặp lại nhiều lần ở 6 vị trí. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: Kết quả thử nghiệm trên cánh đồng mùa thứ hai

Các thông số	Sự kiện			
	C15-15	C4-52	C32-17	C23-6
Tính hiệu quả				
Khả năng chịu hạn trong thời kỳ sinh dưỡng	Có	Có	Có	Có
Năng suất:	Có	Có	Có	Có
Khả năng sinh sản, kiểu hình	Có	Có	Có	Không
Nông học				
Năng suất:	Có	Có	Có	Có
Khả năng sinh sản, kiểu hình	Có	Có	Có	Có
Thử nghiệm trên cánh đồng có đạt không?	Có	Có	Có	Có

Từ thử nghiệm nêu trên, chọn ra được ba sự kiện là C15-15-2, C4-12-5 và C32-17-5 tương ứng mà đáp ứng các chỉ tiêu thử nghiệm trên đồng ruộng. Các sự kiện này được lựa chọn, phát triển thành các dòng ngô chuyển gen để đánh giá các đặc tính tiếp theo.

Ví dụ 2: Đánh giá đặc điểm nông học

Trong thử nghiệm đánh giá hiệu về đặc điểm nông học đối với các sự kiện (được phát triển thành các dòng ngô) thu được từ Ví dụ 1, tiến hành đánh giá trên đồng ruộng với các dòng nền. Các sự kiện C15-15-2, C4-52-1 và C32-17-5 được lựa chọn bố trí đánh giá so với các dòng với nền tương ứng không chứa gen chuyển. Thử nghiệm được đánh giá ngẫu nhiên theo khối nhắc lại ba lần, mỗi dòng gieo 4 hàng, mỗi hàng dài 5 mét, khoảng cách gieo 65x25x1 cm/cây/hốc và được chăm sóc theo quy trình chuẩn. Đối chứng là các cây cùng dòng không chuyển gen (dòng nền). Để thống nhất, ký hiệu các dòng chuyển gen là C15-15-2, C4-52-1 và C32-17-5, còn dòng không chuyển gen (dòng nền) là C7N, C436(MB) và V152 tương ứng.

Phương pháp đánh giá theo hướng dẫn quy trình khảo nghiệm DUS về khảo nghiệm giống ngô QCVN 01-56:2011/BNNPTNT. Kết quả đánh giá về thời gian sinh trưởng, hình thái, khả năng chống đổ, chỉ tiêu năng suất, trọng lượng hạt được thể hiện trong các bảng từ bảng 3 đến bảng 7. Kết quả được xử lý thống kê trên phần mềm IRRISTAT 5.0.

Bảng 3. Đặc điểm hình thái của các sự kiện chuyển gen và các dòng nền

STT	Tên dòng	Tung phần (ngày)	Phun râu (ngày)	Chín sinh lý (ngày)	Chênh lệch TP-PR (ngày)
1	C15-15-2	63	65	115	2
2	C7N	65	67	117	2
3	C4-52-1	63	64	117	1
4	C436	64	66	119	2
5	C32-17-5	68	69	122	1
6	V152	68	69	124	1

Bảng 4. Khả năng chống đổ và mức độ chống chịu một số bệnh chính

STT	Tên dòng	Chống đổ	Bệnh khô vằn	Bệnh gỉ sắt	Sâu đục thân
1	C15-15-2	2	1	1	2
2	C7N	2	1	1	2
3	C4-52-1	2	2	1	2
4	C436	2	2	1	2
5	C32-17-5	1	1	1	2
6	V152	1	1	1	2

Bảng 5. Một số đặc điểm hình thái của các dòng ngô thử nghiệm

STT	Tên dòng	Chiều cao cây		Cao đóng bắp		Dài cờ		Số nhánh cờ	
		Cm	Cv%	cm	Cv%	Cm	CV%	Cm	CV%
1	C15-15-2	144,3	7,9	71,5	6,5	53,2	7,6	14,5	7,6
2	C7N	140,2	7,6	67,4	6,6	46,4	7,8	13,2	7,2
3	C4-52-1	164,5	6,9	80,3	7,1	32,5	7,3	11,4	6,8
4	C436	166,3	6,5	78,2	6,7	31,5	7,3	11,3	6,9
5	C32-17-5	143,6	6,4	61,3	7,6	37,0	5,3	15,8	6,1
6	V152	148,5	6,2	63,5	7,4	38,6	5,6	16,2	6,4

Bảng 6. Các chỉ tiêu cấu thành năng suất của các dòng ngô thử nghiệm

STT	Tên dòng	Chiều dài bắp		Đường kính bắp		Số hàng hạt		Số hạt/hàng	
		Cm	Cv%	cm	Cv%	Cm	CV%	Hạt	Cv%
1	C15-15-2	17,8	7,6	3,2	6,3	11,5	7,0	24,3	5,8
2	C7N	18,3	7,7	3,1	6,8	11,7	7,3	24,1	5,7
3	C4-52-1	13,3	7,2	3,8	6,6	14,6	3,6	25,7	5,1
4	C436	13,1	6,9	3,8	7,0	14,5	4,6	26,4	5,0
5	C32-17-5	16,4	6,8	4,2	5,5	13,8	5,4	33,6	5,5
6	V152	15,7	7,1	4,1	6,1	13,5	5,0	27,5	5,7

Từ kết quả đánh giá đặc điểm nông sinh học trên các sự kiện chuyển gen với các dòng nền cho thấy rằng không có sự khác biệt đáng kể ở hầu hết các chỉ tiêu theo dõi, hay nói cách khác, đối với các chỉ tiêu nông học, cây chuyển gen vẫn giữ được các đặc tính như trên cây ban đầu trong điều kiện bình thường.

Ví dụ 3: Thử nghiệm khả năng chịu hạn cho cây ngô

Để đánh giá đặc tính chịu hạn mong muốn của các sự kiện chuyển gen, các dòng thử nghiệm đánh giá về đặc điểm nông sinh học từ Ví dụ 2 được đánh giá khảo nghiệm về đặc tính chịu hạn. Phương pháp thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp của Camacho và Caraballo (1994).

Thử nghiệm đánh giá khả năng chịu hạn của cây con được tiến hành trong điều kiện nhà lưới với 3 lần nhắc lại cho 2 công thức: CT1 là cây được tưới nước đầy đủ, CT2 trong điều kiện gây hạn nhân tạo, trong đó cây con đến giai đoạn 4-5 lá được tiến hành thử nghiệm chịu hạn nhân tạo bằng cách không tưới nước trong 14 ngày, sau đó phục hồi trong 7 ngày bằng cách tưới nước đầy đủ. Đối chứng là các dòng ngô tương ứng không chuyển gen như nêu trong Ví dụ 2.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: khả năng phục hồi và tỷ lệ sống sót, thể tích rễ (Rv), chiều dài rễ dài nhất (LRL), chiều cao cây, (PH), khối lượng rễ tươi (SFW), khối lượng rễ khô (RDW), khối lượng thân khô (SDW), tỷ lệ rễ khô/thân khô, tổng sinh khối khô (TMD). Số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm IRRISTAT 5.0. Các kết quả được thể hiện trong các bảng từ Bảng 7 đến Bảng 9.

Bảng 7. Các chỉ tiêu đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng ngô thử nghiệm

STT	Tên dòng	Tỷ lệ sống (%)	Dài thân lá			Dài thân rễ		
			CT1	CT2	Tỷ lệ giảm (%)*	CT1	CT2	Tỷ lệ giảm (%)*
1	C15-15-2	45,3	71,4	50,6	29,1	30,5	22,5	26,2
2	C7N	41,5	70,7	49,6	29,8	30,7	21,8	29,0
3	C4-52-1	52,3	68,5	53,5	21,9	31,5	25,7	18,4
4	C436	28,4	71,2	49,4	30,6	28,7	19,5	32,1
5	C32-17-5	53,7	62,4	44,5	28,7	32,3	26,4	18,3
6	V152	27,8	61,5	42,1	31,5	31,5	19,2	39,0
CV(%)			4,4			7,6		
LSD _{0,05}			2,99			2,39		

(*): Tỷ lệ giảm của CT2 (thử nghiệm) so với CT1 (đối chứng)

Bảng 8. Các chỉ tiêu đánh giá khả năng chịu hạn ở các dòng ngô thử nghiệm ở giai đoạn cây con

TT	Dòng	KL thân tươi (g)		Tỷ lệ giảm (%)*	KL rễ tươi (g)		Tỷ lệ giảm (%)*
		CT1	CT2		CT1	CT2	
1	C15-15-2	11,2	2,84	74,6	8,15	2,46	69,8
2	C7N	10,9	2,81	74,2	8,01	2,41	69,9
3	C4-52-1	10,3	2,96	71,3	7,73	2,57	66,8
4	C436	10,1	2,42	76,0	7,71	2,02	73,8
5	C32-17-5	10,8	2,91	73,1	9,02	2,72	69,8
6	V152	10,1	2,34	76,8	9,03	2,16	76,1
CV(%)		6,7			8,4		
LSD _{0,05}		0,53			0,528		

(*): Tỷ lệ giảm của CT2 (thử nghiệm) so với CT1 (đối chứng)

Bảng 9. Các chỉ tiêu đánh giá khả năng chịu hạn ở các dòng ngô thử nghiệm ở giai đoạn cây con

STT	Tên dòng	P thân khô (g)			P rễ khô (g)			rễ/thân khô		Thể tích rễ cm ³		
		CT1	CT2	(*)	CT1	CT2	(*)	CT1	CT2	CT1	CT2	(*)
1	C15-15-2	1,47	0,46	68,7	0,52	0,24	55,8	0,35	0,52	7,45	2,63	64,7
2	C7N	1,45	0,45	69,0	0,5	0,23	54,0	0,34	0,51	7,42	2,61	64,8
3	C4-52-1	1,22	0,52	57,4	0,47	0,26	46,7	0,39	0,5	6,45	2,43	62,3

4	C436	1,18	0,42	64,4	0,45	0,17	61,7	0,38	0,4	6,43	1,96	69,5
5	C32-17-5	1,32	0,51	61,4	0,55	0,27	52,8	0,42	0,53	7,81	2,83	63,8
6	V152	1,28	0,41	68,0	0,53	0,19	61,8	0,41	0,46	7,75	2,38	69,3
CV(%)		8			6,7			8,4		5		
LSD _{0,05}		0,084			0,036			0,044		0,16		

(*): Tỷ lệ giảm của CT2 (thử nghiệm) so với CT1 (đối chứng)

Như vậy, qua kết quả thử nghiệm cho thấy, tất cả các dòng thử nghiệm đều cho thấy có sự giảm về kích thước và trọng lượng so với cây trồng trong điều kiện đủ nước. Tuy nhiên, với các dòng chuyển gen có tỷ lệ giảm thấp hơn so với dòng nền. Qua số liệu trên cho thấy sự kiện C4-52-1 thể hiện khả năng chịu hạn vượt trội so với các dòng thử nghiệm còn lại. Do đó, sự kiện C4-52-1 được lựa chọn để đánh giá khảo nghiệm tiếp theo.

Ví dụ 4: Khảo nghiệm đánh giá khả năng kết hợp vào hệ gen và di truyền của gen *ModiCspB*

ADN hệ gen của cây ngô đại diện cho sự kiện C4-52-1 được dùng cho các phản ứng PCR được phân lập. Theo đó, khoảng chừng 0,1 g mô lá đã được nghiền và đông khô được trộn với 600 µl (microlit) chất đệm phân giải (Tris 100mM, KCl 1 M, EDTA 10mM, pH =9,5), sau đó được ủ tại 65°C trong thời gian từ 45 đến 60 phút. Tiếp theo, ống được trộn lại và bổ sung 200 µl chất đệm kết tủa (natri axetat 5 M, pH =7,0), sau khi trộn đều, phần này được ly tâm. Mỗi phần 600 µl của dung dịch ADN được chuyển vào ống sạch và 500 µl isopropanol đông lạnh được bổ sung để kết tủa ADN. Sau khi ly tâm, hạt ADN được rửa bằng etanol 70%, và sấy khô ngoài không khí, sau đó ADN được tái huyền phù trong 250 µl nước.

Đoạn ADN hệ gen ngô gắn với đoạn chèn gen chuyển được nhân lên để thu được sự kiện C4-52-1 bằng kỹ thuật PCR (TAIL-PCR) mà cơ sở của kỹ thuật này đã được mô tả bởi Liu và cộng sự (Plant Journal 8: 457-463, 1995). Để nhận biết ADN hệ gen kẹp sườn, thiết kế hai cặp mồi lồng nhau dọc theo hệ gen gắn với các tiếp hợp kẹp sườn. Một cặp được thiết kế để đi ra khỏi đầu 5' của caxét biểu hiện được tích hợp và bộ khác được thiết kế để đi ra khỏi đầu 3' của caxét biểu hiện được tích hợp. Mồi sử dụng bao gồm mồi xuôi: ACGGATCCATGGTGGAGGGC và mồi ngược cho gen *ModiCspB*: ACTAGCGGCCGCTTCCTTCGTGA và gen *HygR* bao gồm mồi xuôi:

AAAGCCTGAACTCACCGC và mỗi ngược: GCTTTCCACTATCGGCGA. Kết quả được xác định bằng kỹ thuật lai Southern và realtime-PCR được thể hiện trên Hình 2.

Kết quả đánh giá trên Hình 2 thể hiện đánh giá khảo nghiệm đối với 20 mẫu trong 3 thế hệ liên tiếp (từ T3 đến T5) với 1 là thang chuẩn, 2 là đối chứng dương, 3 là đối chứng âm, là cây không chuyển gen (dòng nền), 5-20, gồm 15 mẫu đại diện cho sự kiện C4-52-1. (A) là kết quả thử nghiệm đánh giá cho thế hệ T3, (B) là kết quả thử nghiệm đánh giá cho thế hệ T4 và (C) là kết quả thử nghiệm đánh giá cho thế hệ T5. Theo đó, cho thấy rằng, tỷ lệ mang gen *modiCspB* của sự kiện C4-52-1 đạt xấp xỉ 100% trên tổng số 15 mẫu đại diện đối với cả 3 thế hệ. Điều này cho thấy rằng, gen *modiCspB* trong sự kiện C4-52-1 được kết hợp và di truyền ổn định vào hệ gen của cây ngô.

Ví dụ 5. Phân tích trình tự vùng đầu nối của gen chuyển của sự kiện C4-52-1

Đoạn gen chuyển được phân tích trình tự ở hai vùng đầu nối (flanking region). Trong chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium*, đoạn T-DNA nằm giữa 2 trình tự lặp RB và LB trên vector được chuyển vào hệ gen thực vật. Vùng đầu nối sát với trình tự RB được gọi là vùng đầu nối 5'. Vùng đầu nối sát với trình tự LB được gọi là vùng đầu nối 3'. Các vùng đầu nối này được phân tích bằng phương pháp Genome Walking PCR.

Tại đầu 5', phương pháp Genome Walking PCR đã nhân được sản phẩm có kích thước khoảng 800 bp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.2. Sau khi giải trình tự và so sánh trình tự này với trình tự vector pCAMBIA 1300 bằng công cụ BLAST. Chúng tôi nhận thấy trình tự thu được có 252 nu trùng khớp với vector pCAMBIA1300 từ vị trí tám mươi 35SproGSP1 đến vị trí vùng bờ phải RB. Phần trình tự còn lại (gạch chân) gồm 563 bp không có sự trùng khớp được dự đoán là vùng trình tự thuộc hệ gen cây ngô của sự kiện C4-52-1. So sánh trình tự này và trình tự này với cơ sở dữ liệu hệ gen ngô B73 (maizegdb.org). Kết quả cho thấy sự tương đồng trên các NST khác nhau, với tỉ lệ tương đồng cao nhất trên NST số 1.

Phần còn lại của trình tự đầu nối 5' (gồm 341 bp) được so sánh với các cơ sở dữ liệu. Kết quả so sánh cho thấy trình tự đầu nối 5' thu được tương đồng với trình tự trên một số nhiễm sắc thể như số 7, số 9, số 3, và số 6 của hệ gen ngô B73.

Tại đầu 3', xác định được một trình tự vùng nối có kích thước 438 bp được nêu trong SEQ ID NO.3. Trình tự này trùng lặp một phần với trình tự ngoài LB của vector pCAMBIA1300. Phần trình tự không trùng lặp (145 bp, gạch chân) được so sánh với hệ gen ngô, nhưng không xác định được trình tự tương đồng. Nguyên nhân có thể do đoạn trình tự thu được quá ngắn và cơ sở dữ liệu của hệ genome ngô B73 có sự khác biệt với hệ gen cây ngô chuyển gen.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

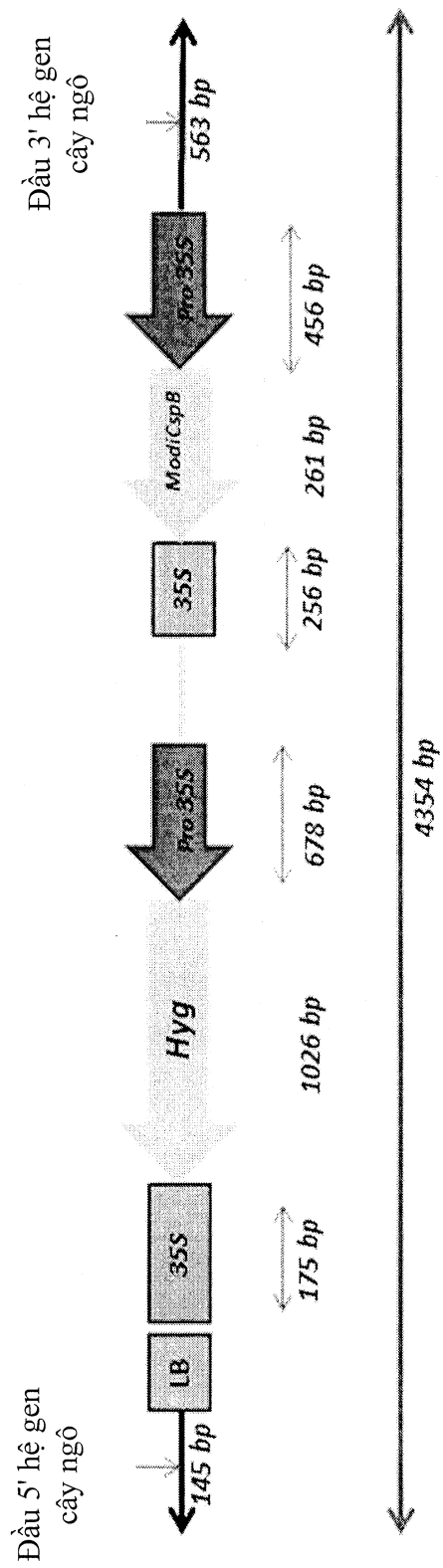
Phân tử ADN tái tổ hợp có nguồn gốc từ sự kiện chuyển gen C4-52-1 được chứng minh có hiệu quả trong việc biểu hiện tính chịu hạn đối với sự kiện C4-52-1 của cây ngô. Bằng kỹ thuật sinh học phân tử, các tác giả đã tạo ra và chọn lọc được sự kiện C4-52-1 để từ đó tạo ra được dòng ngô chuyển gen chịu được hạn, giải quyết được vấn đề hạn hán trong các khu vực trồng ngô, giúp sản xuất nông nghiệp bền vững hơn, giảm thiểu được tác động của yếu tố môi trường, đặc biệt là nạn hạn hán ở các vùng đồi núi phía Bắc và miền Trung trong quá trình canh tác cây ngô.

Cây ngô chuyển gen thu được từ sự kiện C4-52-1 được chứng minh có khả năng chịu hạn và vẫn giữ được các đặc điểm, yếu tố như cây ngô dòng nền. Cây ngô chứa sự kiện C4-52-1 này có khả năng di truyền ổn định qua các thế hệ. Điều này mở ra một hướng nghiên cứu, lai tạo cây chuyển gen có khả năng chịu hạn, trợ giúp cho kỹ thuật lai tạo giống hiện đại.

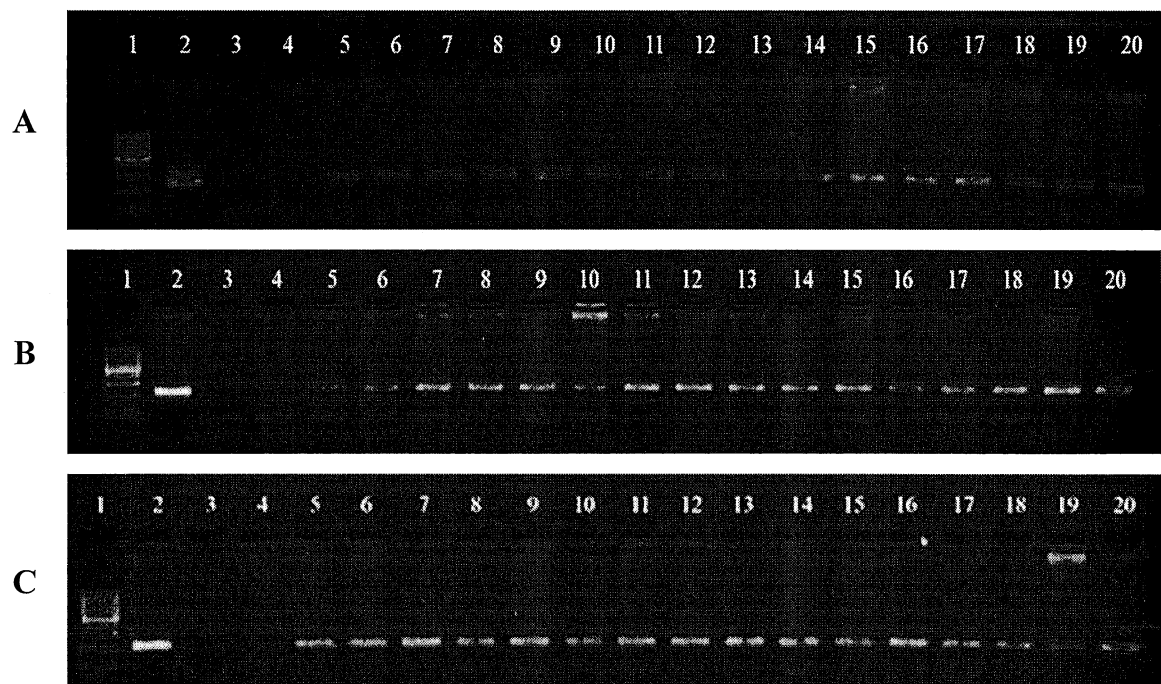
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử ADN tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự bổ sung đầy đủ của chúng, trong đó phân tử này có nguồn gốc từ sự kiện C4-52-1, mẫu đại diện của hạt giống ngô chuyển gen chịu hạn chứa sự kiện C4-52-1 được nộp lưu tại Viện Nghiên cứu Ngô, thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Nội, Việt Nam, với số nộp lưu NL-C4-52-1.
2. Cây ngô chuyển gen chịu hạn chứa sự kiện C4-52-1, trong đó cây ngô này chứa phân tử ADN tái tổ hợp có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 và trình tự bổ sung đầy đủ của chúng, mẫu đại diện cho hạt giống cây ngô này được nộp lưu tại Viện Nghiên cứu Ngô, thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Nội, Việt Nam, với số nộp lưu NL-C4-52-1.

HÌNH 1



HÌNH 2



DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Viện Nghiên cứu Ngô
Thị trấn Phùng, Đan Phượng, Hà Nội
- <120> PHÂN TỬ ADN TÁI TỔ HỢP CÓ NGUỒN GỐC TỪ SỰ KIẾN CHUYỂN GEN C4-52-1
VÀ CÂY NGÔ CHUYỂN GEN CHỊU HẠN CHỨA PHÂN TỬ NÀY
- <130>
<160> 3
<170>
- <210> 1
<211> 4347
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
- <220>
<223> phân tử ADN khảm của ADN hệ gen cây ngô và ADN gen chuyển
- <400> 1
- | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| GTACGGCCTC | AGGTAAAGA | AATTTTTTAA | AATGCATAAA | AAAATTGTGC | AATGCTTCGG | 60 |
| AGCTGGTTGG | TGGCAGGATA | TATTGTGGTG | TAAACAAATT | GACGCTTAGA | CAACTTAATA | 120 |
| ACACATTGCG | GACGTTTTTA | ATGTACTGAA | TTAACGCCGA | ATTAATTCGG | GGGATCTGGA | 180 |
| TTTTAGTACT | GGATTTTGGT | TTTAGGAATT | AGAAATTTTA | TTGATAGAAG | TATTTTACAA | 240 |
| ATACAAATAC | ATACTAAGGG | TTTCTTATAT | GCTCAACACA | TGAGCGAAAC | CCTATAGGAA | 300 |
| CCCTAATTCC | CTTATCTGGG | AACTACTCAC | ACATTATTAT | GGAGAAACTC | GAGCTTGTCG | 360 |
| ATCGACAGAT | CCGTCGGCA | TCTACTCTAT | CTCGGACGAG | TGCTGGGGCG | TCGGTTTCCA | 420 |
| CTATCGGCGA | GTACTTCTAC | ACAGCCATCG | GTCCAGACGG | CCGCGCTTCT | GCGGGCGATT | 480 |
| TGTGTACGCC | CGACAGTCCC | GGCTCCGGAT | CGGACGATTG | CGTCGCATCG | ACCCTGCGCC | 540 |
| CAAGCTGCAT | CATCGAAATT | GCCGTCAACC | AAGCTCTGAT | AGAGTTGGTC | AAGACCAATG | 600 |
| CGGAGCATAT | ACGCCCAGAG | TCGTGGCGAT | CCTGCAAGCT | CCGGATGCCT | CCGCTCGAAG | 660 |
| TAGCGCGTCT | GCTGCTCCAT | ACAAGCCAAC | CACGGCCTCC | AGAAGAAGAT | GTTGGCGACC | 720 |
| TCGTATTGGG | AATCCCCGAA | CATCGCCTCG | CTCCAGTCAA | TGACCGCTGT | TATGCGGCCA | 780 |
| TTGTCCGTCA | GGACATTGTT | GGAGCCGAAA | TCCGCGTGCA | CGAGGTGCCG | GACTTCGGGG | 840 |
| CAGTCCCTCG | CCCAAAGCAT | CAGCTCATCG | AGAGCCTGCG | CGACGGACGC | ACTGACGGTG | 900 |
| TCGTCCATCA | CAGTTTGCCA | GTGATACACA | TGGGGATCAG | CAATCGCGCA | TATGAAATCA | 960 |
| CGCCATGTAG | TGTATTGACC | GATTCCTTGC | GGTCCGAATG | GGCCGAACCC | GCTCGTCTGG | 1020 |
| CTAAGATCGG | CCGCAGCGAT | CGCATCCATA | GCCTCCGCGA | CCGGTTGTAG | AACAGCGGGC | 1080 |
| AGTTTCGGTTT | CAGGCAGGTC | TTGCAACGTG | ACACCCTGTG | CACGGCGGGA | GATGCAATAG | 1140 |
| GTCAGGCTCT | CGCTAAACTC | CCCAATGTCA | AGCACTTCCG | GAATCGGGAG | CGCGGCCGAT | 1200 |
| GCAAAGTGCC | GATAAACATA | ACGATCTTTG | TAGAAACCAT | CGGCGCAGCT | ATTTACCCGC | 1260 |
| AGGACATATC | CACGCCCTCC | TACATCGAAG | CTGAAAGCAC | GAGATTCTTC | GCCCTCCGAG | 1320 |
| AGCTGCATCA | GGTCGGAGAC | GCTGTGGAAC | TTTTTCGATCA | GAAACTTCTC | GACAGACGTC | 1380 |
| GCGGTGAGTT | CAGGCTTTTT | CATTTCTTTG | CCATCTCATT | GCCCCCGGG | ATCTGCGAAA | 1440 |
| GCTCGAGAGA | GATAGATTTG | TAGAGAGAGA | CTGGTGATTT | CAGCGTGTCC | TCTCCAAATG | 1500 |
| AAATGAACTT | CCTTATATAG | AGGAAGGTCT | TGCGAAGGAT | AGTGGGATTG | TGCGTCATCC | 1560 |
| CTTACGTCAG | TGGAGATATC | ACATCAATCC | ACTTGCTTTG | AAGACGTGGT | TGGAACGTCT | 1620 |
| TCTTTTTCCA | CGATGCTCCT | CGTGGGTGGG | GGTCCATCTT | TGGGACCACT | GTCGGCAGAG | 1680 |
| GCACTTTGAA | CGATAGCCTT | TCCTTTATCG | CAATGATGGC | ATTTGTAGGT | GCCACCTTCC | 1740 |
| TTTTTCTACTG | TCCTTTTGAT | GAAGTGACAG | ATAGCTGGGC | AATGGAATCC | GAGGAGTTT | 1800 |
| CCCGATATTA | CCCTTTGTTG | AAAAGTCTCA | ATAGCCCTTT | GGTCTTCTGA | GACTGTATCT | 1860 |
| TTGATATTCT | TGGAGTAGAC | GAGAGTGTCT | TGCTCCACCA | TGTTATCACA | TCAATCCACT | 1920 |
| TGCTTTGAAG | ACGTGGTTGG | AACGTCTTCT | TTTTCCACGA | TGCTCCTCGT | GGGTGGGGGT | 1980 |
| CCATCTTTGG | GACCACTGTC | GGCAGAGGCA | TCTTGAACGA | TAGCCTTTCC | TTTATCGCAA | 2040 |
| TGATGGCATT | TGTAGGTGCC | ACCTTCCTTT | TCTACTGTCC | TTTTGATGAA | GTGACAGATA | 2100 |
| GCTGGGCAAT | GGAATCCGAG | GAGGTTTCCC | GATATTACCC | TTTGTGAAA | AGTCTCAATA | 2160 |
| GCCCTTTGGT | CTTCTGAGAC | TGTATCTTTG | ATATTCTTGG | AGTAGACGAG | AGTGTCTGTC | 2220 |
| TCCACCATGT | TGGCAAGCTG | CTCTAGCCAA | TACGCAAACC | GCCTCTCCCC | GCGCGTTGGC | 2280 |

CGATTCATTA	ATGCAGCTGG	CACGACAGGT	TTCCCGACTG	GAAAGCGGGC	AGTGAGCGCA	2340
ACGCAATTAA	TGTGAGTTAG	CTCACTCATT	AGGCACCCCA	GGCTTTACAC	TTTATGCTTC	2400
CGGCTCGTAT	GTTGTGTGGA	ATTGTGAGCG	GATAACAATT	TCACACAGGA	AACAGCTATG	2460
ACCATGATTA	CGAATTCGAG	CTCGGTACCC	GGGGATCCTC	TAGAGTCGAC	CTGCAGGCAT	2520
GCAAGCTTGC	ATGCCTGCAG	GTCACCTGGAT	TTTGGTTTTA	GGAATTAGAA	ATTTTATTGA	2580
TAGAAGTATT	TTACAAATAC	AAATACATAC	TAAGGGTTTC	TTATATGCTC	AACACATGAG	2640
CGAAACCCTA	TAAGAACCCT	AATTCCCTTA	TCTGGGAAC	ACTCACACAT	TATTCTGGAG	2700
AAAATAGAGA	GAGATAGATT	TGTAGAGAGA	GACTGGTGAT	TTTTGCGGAC	TCTATCGACG	2760
GATCGGGCTA	GAGTTCGTCT	TTGGAACCAT	TCAGATCCTC	TTCTGAGATG	AGTTTTTGTT	2820
CTGCGGGCGC	TTCTTTCGTG	ACGTTTCGCG	CCTGCGGACC	GCGGTTTCCC	TCGACGATCT	2880
CGAAGGAGAC	GGCCTGCCCC	TCTTCAGGG	TCTTGAACCC	TTCGCCCTGG	ATGGCGGAGA	2940
AGTGGACGAA	CACATCGTCT	TGACCCTCCA	CCTCGATGAA	GCCGAAGCCC	TTCTCGGAGT	3000
TGAACCACTT	CACCTTGCCC	TCCACCATGG	ATCCTGCTAA	ACATGTGCTT	GTAAAGAGAA	3060
GCAAGGAAAG	TGAAAGCAAA	GATAGAAAAG	GTTTGGGAAGC	CATGGTTCCC	GGCCGGGTCA	3120
GATCCTCTAG	AGTCGATCGA	GGTCCTCTCC	AAATGAAAc	ccatgTGAA	TTCTTTATAT	3180
AGAGGAAGGG	TCTTGCGAAG	GATAGTGGGA	TTGTGCGTCA	TCCCTTACGT	CAGTGGAGAT	3240
ATCACATCAA	TCCACTTGCT	TTGAAGAGCT	GGTTGGAACG	TCTTCTTTT	CCACGATGTT	3300
CCTCGTGGGT	GGGGGTCCAT	CTTTGGGACC	ACTGTCGGTA	GAGGCATTCT	TGAACGATAG	3360
CCTTTCTTTT	ATCGCAATGA	TGGCATTTGT	AGAAGCCATC	TTCTTTTCT	ACTGTCCTTT	3420
CGATGAAGTG	ACAGATAGCT	GGGCAATGGA	ATCCGAGGAG	GTTTCCCGAT	ATTACCTTTT	3480
GTTGAAAAGT	CTCAATAGCC	CTCTGGTCTT	CTGAGACTGT	ATCTTTGATA	TTCTTGAGAT	3540
AGACGAGAGT	GTCGTGCTCC	ACCATGTTGA	CCTGCAGGCA	TGCAAGCTTG	GCACTGGCCG	3600
TCGTTTTTACA	ACGTCGTGAC	TGGGAAAACC	CTGGCGTTAC	CCAACCTAAT	CGCCTTGACG	3660
CACATCCCCC	TTTCGCCAGC	TGGCGTAATA	GCGAAGAGGC	CCGCACCGAT	CGCCCTTCCC	3720
AACAGTTGCG	CAGCCTGAAT	GGCGAATGCT	AGAGCAGCTT	GAGCTTGGAT	CAGATTGTCTG	3780
TTTCTTGACA	GGATATCGTC	TGAAACCTTT	TGAGGTATGA	CTGAAGAGTC	TCATCCCCTC	3840
GGCGCCTGAT	GGATTTGAGG	TCCCATGGCT	GCGCYGGCTT	GTGARAGAGA	GATTGGAAGY	3900
TGGCGATWAA	GCGCCGACTG	AAGTCGCTCC	AGTCGTCGAT	GTAGTGTGAG	GGTAGGTGTC	3960
CTAGCCATTG	CAGCGCATCT	TGGCCGAGGA	TGATGGGTAA	GTACGCAGTC	ATCACATCTT	4020
CAGTTGCCCC	TGCGGCTCGG	GCAATAGTGG	TACAGACGAC	CAACCAGCCT	GGGTCTTGCT	4080
TAGGCTCATA	CTTGTCGACG	TTGGAGACTT	TGAAGTTAGG	GGGCCACTGA	ATGGCCCCGA	4140
GACGTGGAGT	GAGCGTCGAT	ACTCCACATG	TGTCCTSTCTG	TCGATGTTGA	TGACGTGGGT	4200
CCCGGGRAGG	GGAGTTGTCTG	ATGTGGTGCC	TCGACCGTTC	CCGGGTGCTA	CCACCGGTTG	4260
AGGCGATGGC	CGACTCAACT	CTAGTGGCCT	GACTTCGCGC	AGGGATGACG	TGATCCTGAT	4320
CATACTCTTC	TCGGCGTCGA	ATCTCGT				4347

<210> 2

<211> 815

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> phân tử ADN khảm của ADN hệ gen cây ngô và ADN gen chuyển

<400> 2

AGCTTGGCAC	TGGCCGTCGT	TTTACAACGT	CGTGACTGGG	AAAACCCTGG	CGTTACCCAA	60
CTTAATCGCC	TTGCAGCACA	TCCCCCTTTC	GCCAGCTGGC	GTAATAGCGA	AGAGGCCCGC	120
ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTGCRACG	CTGAATGGCG	AATGCTAGAG	CAGCTTGAGC	180
TTGGATCAGA	TTGTCGTTTC	CCGCCTTCAG	TTTAAACTAT	CAGTGTTTGA	CAGGAWATAT	240
TGGCGGGTAA	ACTTGACAGG	ATATCGTCTG	AAACCTTTTG	AGGTATGACT	GAAGAGTCTC	300
ATCCCCTCGG	CGCCTGATGG	ATTTGAGGTC	CCATGGCTGC	GCTGGCTTGT	CARAGAGAGA	360
TTGGAAGYTG	GCGATWAAGC	GCCGACTGAA	GTCGCTCCAG	TCGTGATGAT	AGTGTCAGGG	420
TAGGTGTCCT	AGCCATTGCA	GCGCATCTTG	GCCGAGGATG	ATGGGTAAAGT	ACGCAGTCAT	480
CACATCTTCA	GTTGCCCTTG	CGGCTCGGGC	AATAGTGGTA	CAGACGACCA	ACCAGCCTGG	540
GTCCTGCTTA	GGCTCATACT	TGTCGACGTT	GGAGACTTTG	AAGTTAGGGG	GCCACTGAAT	600
GGCCCCGAGA	CGTGGAGTGA	GCGTCGATAC	TCCACATGTG	TCCTSTGTGTC	GATGTTGATG	660
ACGTCGGTCC	CGGGRAGGGG	AGTTGTCGAT	GTGGTGCTC	GACCGTCCC	GGGTGCTACC	720
ACCGGTTGAG	GCGATGGCCG	ACTCAACTCT	AGTGGCCTGA	CTTCGCGCAG	GGATGACGTG	780
ATCCTGATCA	TACTCTTCTC	GGCGTCGAAT	CTCGT			815

<210> 3
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> phân tử ADN khám của ADN hệ gen cây ngô và ADN gen chuyển

<400> 3

TCTTAGCTTT	ACATGTTTTG	TATTTGTAAA	TACTTCTATC	AATAAAATTT	CTAATTCCTA	60
AAACCAAAT	CCAGTACTAA	AATCCAGATC	CCCCGAATTA	ATTCGGCGTT	AATTCAGTAC	120
ATTAAAAACG	TCCGCAATGT	GTTATTAAGT	TGTCTAAGCG	TCAATTTGTT	TACACCACAA	180
TATATCCTGC	CACCAACCAG	GCAACAGCTC	CCCGACCGGC	AGCTCGGCAC	AAAGTGGCCA	240
CGCGGTACAG	GAAAACCATC	AATCCGGGAC	GGCGTCAGCG	GGAGAGCGTT	GTAAGGCTAA	300
ATACTTTGGT	TTGTTACCGA	TGCTATTCGG	AATAACCGTT	GCTATTCTGG	TGGGACAGAA	360
GAAGGAATGA	TCTCCCGTAC	GGCCTCAGGT	TAAAGAAATT	TTTTAAAATG	CATAAAAAAA	420
TTGTGCAATG	CTTCGGAG					438